

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude de l'activation transcriptionnelle du gène wak1 chez Arabidopsis thaliana.

Godefroid, Arnaud

Award date:
2001

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Etude de l'activation transcriptionnelle du gène *wak1* chez
*Arabidopsis thaliana***

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Arnaud GODFROID

Juin 2001

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Etude de l'activation transcriptionnelle du gène *wak1* chez *Arabidopsis thaliana*

GODFROID Arnaud

Résumé

Les protéines WAK (Wall-Associated Kinase) sont des protéines transmembranaires découvertes il y a peu chez *Arabidopsis thaliana*. Leur domaine extra-cellulaire associé à la paroi et leur domaine kinase cytoplasmique semblent indiquer que ces protéines interviendraient dans la communication des informations de la paroi vers le cytosol. WAK1 est l'isoforme induite en cas d'attaque par un pathogène et son induction semble être un pré-requis pour que la plante puisse tolérer la présence d'acide salicylique produit dans ces conditions. Les voies de transduction du signal menant à l'activation transcriptionnelle de *wak1* ne sont pas encore élucidées.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation de *wak1*, nous avons mesuré, au cours de ce mémoire, l'effet de modulateurs agissant sur les taux de transcrits de *wak1* ainsi que sur la quantité de protéines WAK1 dans des plantules d'*Arabidopsis thaliana* cultivées *in vitro*.

Nous avons montré que l'acide salicylique, le peroxyde d'hydrogène, les oligogalacturonides et les pectinases induisent une augmentation du taux de transcrits de *wak1*. Les inhibiteurs de kinases testés provoquent, quant à eux, une diminution du taux de transcrits de *wak1*. Ces résultats ont pu être corrélés avec des variations similaires de la quantité de protéines WAK1 mesurées suite aux mêmes traitements.

Les résultats obtenus suggèrent que la régulation de WAK1 est sensible à l'intégrité de la paroi cellulaire, implique une cascade de kinases et est modulable par un choc oxydatif.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2001

Promoteur: J. Messiaen

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNg	ADN génomique
APS	Ammonium persulfate
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Albumine bovine
BrEt	Bromure d'éthidium
°C	Degré celsius
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
dNTP	Desoxyribonucléotide triphosphate
DO	densité optique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique
EGF	Epidermal growth factor
GTP	Guanosine triphosphate
HPLC	High performance liquide chromatography
IL-1	Interleukine-1
IPTG	Isopentenylthiogalactoside
kDa	kiloDalton
M	molaire
MAPK	Mitogen activated protein kinase
ml	millilitre
mM	millimolaire
MuLV	Murine leukemia virus
NADPH	Nicotineamide adenine dinucleotide phosphate
NFκB	Nuclear factorκB
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PLA ₂	Phospholipase A ₂
pb	paire de bases
PRB	Proretinoblastome
RNase	Ribonucléase
SDS	Sodium dodécyl sulfate
TEMED	N,N,N',N',-Tétraméthyl ethylène diamine
TGFβ	Transforming growth factor
TMV	Tobacco mosaic virus
Tris	Tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
μl	microlitre
UV	ultraviolets
V	volts
X-GAL	5-bromo-4-chloro-3-indoyl-galacturonide

« L'imagination est plus importante que le savoir »

A. Einstein

Je tiens à remercier, en premier lieu et tout particulièrement, le professeur Messiaen et le professeur Van Cutsem pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire et permis de mener à bien ce travail de fin d'étude

Un grand merci à Annabelle pour ta gentillesse, tes nombreux conseils, ta disponibilité et ta grande patience malgré toutes mes « gaffes »

Je remercie également tous les membres du jury, X. Debolle, P. Lestrade, T. Arnould et P. van Cutsem, pour avoir consacré une partie de leur précieux temps à la lecture de mon travail

Merci à toutes les personnes de l'unité pour leur sympathie, leurs conseils et leur bonne humeur, à Pierre, Cindy, Mallory, Françoise Liners, Françoise Lonnoy, Catherine, Nicolas, Romy, Stéphanie, Olivier...

Merci à tous mes ami(e)s pour m'avoir encourager durant ces quatres années d'études

Merci à ma famille

Table des matières

I	Introduction	8
1.	Introduction générale	8
2.	Base moléculaire de l'interaction plante-pathogène	10
3.	Gènes de résistance de la plante et gènes d'avirulence du pathogène..	11
	a) Produits des gènes de résistance chez la plante	11
	i. <i>Domaine sérine-thréonine kinase</i>	11
	ii. <i>Domaine à répétitions riches en leucines</i>	11
	iii. <i>Domaine de liaison des nucléotides</i>	12
	iv. <i>Domaine leucine zipper</i>	12
	v. <i>Domaine Toll/Interleukine-1/Résistance</i>	13
	vi. <i>Autres domaines structuraux</i>	13
	b) Facteurs d'avirulence interagissant avec les récepteurs kinases	13
4.	Mécanismes de protection de la plante.....	16
	a) Production de dérivés actifs de l'oxygène	17
	b) Production d'oxyde nitrique	18
	c) Synthèse de phytoalexines	19
	d) Production de protéines PR.....	19
	e) Production d'acide salicylique et « vaccination » de la plante	20
	f) Production de méthyljasmonate	21
	g) Renforcement de la paroi cellulaire	22
5.	Autres récepteurs kinases des végétaux	24
	a) Récepteurs sérine-thréonine kinase associés à la paroi : les protéines WAK.....	24
	b) Récepteurs kinase et développement	25
	i. <i>BRIL, le récepteur des brassinostéroïdes</i>	25
	ii. <i>Le récepteur SRK et l'incompatibilité pollinique</i>	27
	iii. <i>Le récepteur CLAVATA et la formation des méristèmes</i>	29
	iv. <i>Les phytochromes et la photomorphogenèse</i>	30
	c) Récepteurs à histidine kinase	31
II	Objectifs du mémoire	33
III	Matériels et méthodes.....	34
1.	Matériel.....	34
	a) Culture d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	34
	b) Culture d' <i>E. coli</i>	34
	c) Liste des substances pharmacologiques et modulateurs utilisés.....	35
2.	Méthodes relatives aux acides nucléiques	36
	a) Extraction d'ARN totaux au TRIzol®	36
	b) Dosage des acides nucléiques	37
	i. <i>Dosage des acides nucléiques au spectrophotomètre</i>	37
	ii. <i>Dosage des acides nucléiques dans un gel d'agarose</i>	37
	c) Réaction de PCR.....	37
	d) Réaction de RT-PCR.....	38
	i. <i>Synthèse du premier brin de cDNA</i>	38

ii.	<i>Réaction de PCR sur ADNc</i>	38
e)	Gel d'électrophorèse	39
f)	Protocole de quantification des acides nucléiques	39
g)	Purification et séquençage d'un produit PCR	40
i.	<i>Purification</i>	40
ii.	<i>Réaction de séquençage</i>	40
h)	Clonage dans pCRII	40
i)	Transformation de bactéries	41
j)	Miniprep d'ADN plasmidique d' <i>E.coli</i>	41
2.	Méthodes relatives aux protéines	43
a)	Extraction de protéines végétales	43
b)	Electrophorèse SDS-PAGE	43
c)	Coloration des protéines au bleu de coomassie	44
d)	Extraction de protéine totales de <i>E.coli</i>	44
e)	Dot-blot	45
f)	Western-blot	45
g)	Dosage colorimétrique des protéines par la méthode Bradford	46
4.	Protocole de purification des oligopectates de DP\geq9	48
IV	Résultats et discussion	50
1.	Rappel des objectifs du mémoire	50
2.	Mise au point des conditions expérimentales	50
3.	Analyse des variations des taux de transcrits <i>wak1</i>	51
a)	Mise au point de la technique de RT-PCR « semi-quantitative »	51
i.	<i>Généralités sur la RT-PCR « semi-quantitative »</i>	51
ii.	<i>Définition d'amorces spécifiques de <i>wak1</i> utilisables en RT-PCR</i>	52
iii.	<i>Vérification de la spécificité de l'amplification</i>	53
iv.	<i>Effet de la variation du nombre de cycles d'amplification</i>	53
v.	<i>Le standard externe</i>	54
vi.	<i>Analyse des taux de transcrits de <i>wak1</i> après un traitement à l'acide salicylique</i>	54
b)	Choix des substances testées	56
c)	Effet de constituants de la paroi végétale et d'enzymes pectolytiques sur la transcription de <i>wak1</i>	57
i.	<i>Généralités sur l'acide polygalacturonique et les oligogalacturonides</i>	57
ii.	<i>Effet de l'acide polygalacturonique et des oligogalacturonides</i>	57
iii.	<i>Effet des pectinases sur la transcription de <i>wak1</i></i>	59
d)	Effet de messagers secondaires sur la transcription de <i>wak1</i>	59
i.	<i>Effet du peroxyde d'hydrogène</i>	59
ii.	<i>Effet du calcium</i>	60
e)	Effet des modulateurs de kinases sur la transcription de <i>wak1</i>	61
i.	<i>Effet d'un activateur de kinases</i>	61
ii.	<i>Effet des inhibiteurs de kinases</i>	61
f)	Conclusion générale concernant l'analyse des variations des taux de transcrits	62
4.	Etude des variations de la quantité de protéines WAK1	63
a)	Mise au point des conditions d'utilisation des anticorps anti-WAK1	63
i.	<i>Historique de la production des anticorps polyclonaux</i>	63
ii.	<i>Test des anticorps en dot-blot</i>	64

iii.	<i>Mise au point de la détection de WAK1 en western-blot</i>	64
b)	Quantification des protéines WAK1 suite à différents traitements	65
i.	<i>Essais de quantification sur notre matériel de référence</i>	65
ii.	<i>Analyse des quantités de protéines en dot-blot</i>	66
c)	Conclusion générale concernant l'analyse des variations des quantités de protéines	67
V	Discussion générale	68
VI	Perspectives	73
VII	Annexes	74
VIII	Bibliographie	75

I

Introduction

I

Introduction

I Introduction

1. Introduction générale

Les plantes doivent en permanence faire face aux attaques d'un grand nombre de pathogènes tels que des bactéries, des virus, des champignons, des invertébrés ou encore au parasitisme d'autres plantes.

A cause de leur immobilité et l'impossibilité de répondre aux attaques de façon comportementale, chaque cellule végétale possède un système de défense inductible. Le « système immunitaire » de la plante est donc différent de celui des animaux chez lesquels des cellules spécialisées sont rapidement mobilisées au niveau du site d'infection afin de tuer l'intrus ou de limiter sa prolifération. Malgré ce contraste, les plantes sauvages sont rarement infectées dans la nature et, si elles sont touchées par une maladie, cela ne concerne généralement qu'un nombre restreint d'individus ou une zone limitée de tissu.

Les raisons qui poussent la recherche à étudier les interactions entre les plantes et les microbes sont multiples :

- La connaissance et le contrôle des mécanismes qui régissent les interactions entre les plantes et les pathogènes permettront de mieux protéger les plantes de grande culture davantage sujettes aux maladies.
- De telles études permettront d'élucider les mécanismes moléculaires par lesquels les plantes répondent aux stress en général.
- Enfin, cela permettra de comprendre comment des organismes appartenant à des règnes différents communiquent entre eux.

La perception de signaux, exogènes ou endogènes, par les différentes parties de la plante grâce à des récepteurs est donc capitale pour la survie de la plante. La cellule végétale est, en effet, en permanence stimulée par une grande quantité de messages auxquels elle doit répondre de façon appropriée : soit, rapidement en activant des protéines présentes de façon constitutive, soit en assurant la transcription de gènes spécifiques.

L'importance de la perception de l'environnement par la plante a été révélée par le programme de séquençage d'*Arabidopsis thaliana*. Plus de 300 gènes codant pour des

récepteurs membranaires ont été recensés et la fonction de la majorité de ceux-ci est encore inconnue .

Dans ce mémoire, nous allons nous focaliser sur une famille de récepteurs membranaires nommés WAK (Wall-Associated Kinase). La famille WAK comporte cinq gènes impliqués dans des réponses aussi variées que la différenciation cellulaire, la croissance du tube pollinique ou la réponse de défense face aux pathogènes. Toutes les isoformes encodent des protéines transmembranaires associées à des constituants de la paroi et possédant un domaine sérine-thréonine kinase intracellulaire. De par leur structure, ces protéines sont de bonnes candidates pour assurer la transmission des informations de la paroi vers le cytoplasme.

Avant d'aborder nos résultats, nous allons passer en revue les « moyens » utilisés par la plante pour percevoir et repousser un agent pathogène ainsi que la fonction de quelques récepteurs kinases membranaires connus impliqués dans le développement des végétaux.

2. Base moléculaire de l'interaction plante-pathogène

L'interaction plante-pathogène peut être décrite par un modèle relativement simple, le modèle « gène pour gène ». Ce modèle implique une reconnaissance spécifique du pathogène par la plante et la mise en place d'une série de mécanismes de défense efficaces par celle-ci. Les gènes de la plante qui interviennent dans cette réponse sont appelés gènes de résistance (ou gène-R) et, à chaque gène de résistance chez la plante, correspond un gène d'avirulence chez le pathogène (ou gène-Avr). Le gène-R peut, par exemple, coder pour un récepteur et le gène-Avr pour un peptide servant de ligand au récepteur. La reconnaissance de l'un par l'autre sera le stimulus déclencheur de la réponse de défense chez la plante. L'interaction plante-pathogène peut donc se résumer en une reconnaissance spécifique du produit du gène d'avirulence par le produit du gène de résistance.

Cette interaction peut être compatible ou incompatible. Dans le premier cas, le produit du gène-Avr n'est pas reconnu par le produit du gène-R et le pathogène n'est pas gêné dans sa progression par le « système immunitaire » de la plante. Dans le deuxième cas, il y a une reconnaissance du pathogène par la plante qui s'accompagne d'une réponse de défense et de la destruction de l'intrus (**Fig.1**). Cette dernière se caractérise par une réaction dite « hypersensible », au cours de laquelle les cellules infectées subissent une mort programmée (*Jones et al.,1996*), ainsi que par la production d'espèces réactionnelles de l'oxygène, la synthèse de NO, la production de phytoalexines (des métabolites secondaires à action antimicrobienne), la synthèse de protéines PR (pathogenesis-related proteins) et le renforcement de la paroi cellulaire (*Dixon et al.,1994*). Enfin, des messagers secondaires importants, tels que le peroxyde d'hydrogène, l'acide salicylique ou la systémine, seront produits pour « immuniser » la plante.

3. Gènes de résistance de la plante et gènes d'avirulence du pathogène

a) Produits des gènes de résistance chez la plante

Les protéines de résistance assument deux fonctions basiques : reconnaître le produit d'avirulence du pathogène et ensuite, activer la transduction du signal menant à la mise en place des réponses de défense. Les protéines de résistance peuvent être soit des récepteurs transmembranaires, soit des récepteurs cytosoliques (**Fig.2**).

Quelque soit leur spécificité et l'espèce à laquelle elles appartiennent, les protéines de résistance sont très similaires suggérant des mécanismes conservés d'activation des défenses.

Six grandes catégories de protéines de résistance ont été identifiées et classées sur base des domaines fonctionnels qui les caractérisent (**Tableau 1**).

i. *Domaine sérine-thréonine kinase*

Un des premiers gènes de résistance cloné est le gène *Pto*, assurant la résistance contre *Pseudomonas syringae* chez la tomate. Ce gène code pour une protéine cytosolique présentant un domaine de type sérine-thréonine kinase et constitue le « récepteur » intracellulaire d'un facteur d'avirulence qui est injecté dans le cytosol par l'agent pathogène.

Ce domaine sérine/thréonine kinase se retrouve aussi dans d'autres protéines encodées par des gènes de résistance chez d'autres espèces. Onze sous-domaines ainsi que 15 acides aminés invariants propres aux protéines kinases y compris les régions conservées qui phosphorylent les résidus sérine et thréonine ont été identifiés dans la protéine *Pto* et chez les autres kinases encodées par les gènes de résistance (*Hawks et al., 1988*). La conservation d'un tel domaine associé ou non à d'autres domaines met en évidence l'importance des kinases dans la transduction du signal et la mise en place des mécanismes de défense.

ii. *Domaine à répétitions riches en leucines (LRRs)*

Les LRRs (leucine-rich repeats) sont des répétitions multiples d'un motif de 24 acides aminés (*Kobe et al., 1994*) contenant des leucines ou d'autres résidus hydrophobes à intervalles réguliers : LxxLxxLxxLxLxx(N)xLxGxIPxx. Le domaine LRR forme un feuillet β conservé où les résidus entourant les leucines semblent être hypervariables et conférer la spécificité envers le produit du gène d'avirulence du pathogène (**Fig.3**). Ces mêmes motifs sont connus pour intervenir dans les interactions protéines-protéines ou ligand-récepteur chez d'autres espèces (l'interaction Ras-adénylate cyclase chez la levure, par exemple ; *Bent et al., 1994*).

L'importance des motifs LRRs est capitale pour la résistance de la plante vis-à-vis d'un agent pathogène. Un exemple est fourni par les protéines Rps2 et Rpm1 mis en évidence chez *Arabidopsis thaliana* et reconnaissant, respectivement, les facteurs d'avirulence AvrRpt2 et avrRpm1 produits par *Pseudomonas syringae*. Des mutations dans ces protéines de résistance qui se traduisent par le changement d'un acide aminé dans la région LRR entraîne une perte de la résistance (Bent et al., 1994).

iii. Domaine de liaison des nucléotides (NBS, nucleotide binding site)

La plupart des protéines de résistance avec un motif LRR possèdent également un domaine de liaison des nucléotides (ou P-loop) dont la séquence consensus est : GxxxxGK (T/S).

Le rôle des domaines NBS des protéines de résistance dans le déclenchement de la réponse de défense de la plante est inconnu. On suspecte cependant que la fixation de nucléotides triphosphates pourrait altérer l'interaction entre le récepteur et d'autres membres de la cascade de transduction du signal impliqués dans la réaction de défense. Des expériences de mutagenèse dirigée contre cette zone de la protéine empêchent, en effet, la plante de développer une réponse hypersensible (Bent et al., 1996).

Le domaine NBS n'est pas caractéristique des protéines de résistance. On le retrouve également chez des protéines à activité de liaison de l'ATP ou du GTP telles que Ras ou le facteur d'élongation du ribosome (Saraste et al., 1990).

iv. Domaine leucine zipper

Au sein de la famille des protéines présentant des motifs LRR ou NBS, on trouve une sous-catégorie possédant, en plus, un domaine de type leucine zipper. Ces domaines sont connus pour leur rôle dans l'homo- ou l'hétérodimérisation des facteurs de transcription eucaryotes, mais aussi dans l'interaction protéine-protéine (Alber et al., 1992).

Encore une fois, malgré des études de structure cristallographique et de caractérisation physico-chimique, on connaît mal le rôle des domaines leucine zipper dans la fonction des protéines de résistance. Comme pour le domaine LRR, on pense que les domaines leucine zipper sont importants pour l'interaction avec d'autres protéines impliquées dans la transduction du signal.

v. *Domaine Toll/Interleukine-1/Résistance (TIR)*

Certains gènes de résistance encodent des protéines avec un domaine N-terminal présentant des similarités avec le domaine cytoplasmique du récepteur de la protéine Toll qui fixe la polarité dorso-ventrale chez la drosophile, du récepteur à l'IL-1 des mammifères impliqué, entre autres, dans la régulation des gènes des immunoglobulines et d'une catégorie de récepteurs mammaliens Toll-like impliqués dans la reconnaissance du lipopolysaccharide bactérien.

En plus de la similarité de séquence, on peut établir un parallèle entre les voies contrôlées par Toll et l'IL-1 chez les animaux et les gènes de résistance chez les végétaux et les réactions qui en dérivent. Dans un cas comme dans l'autre, un lien fonctionnel peut être établi avec la production de dérivés actifs de l'oxygène et un choc oxydatif assurant une fonction protectrice des cellules (*Dangl et al., 1996*). On retrouve un parallélisme entre la voie contrôlée par NFκB chez les cellules animales et le déclenchement du choc oxydatif chez les végétaux car on a mis en évidence une protéine végétale, NIM1, qui présente de fortes analogies avec IκB. A l'heure actuelle, on n'a cependant pas encore trouvé d'homologue de NFκB chez les végétaux (*Uknes et al., 1997 ; Dong et al., 1997*).

Le domaine TIR des protéines de résistance semble d'avantage impliqué dans la signalisation que dans la fixation de ligand et l'interaction protéine-protéine.

vi. *Autres domaines structuraux*

On a mis en évidence des protéines de résistance avec des domaines tout à fait différents de ceux décrits précédemment. Certains présentent des similarités avec des protéines impliquées dans la détoxification. C'est le cas, par exemple, de la protéine Hm1 du maïs, une réductase dépendante du NADPH qui inactive les toxines produites par certaines espèces de champignons (*Meeley et al., 1992*).

D'autres sont des récepteurs couplés aux protéines G tel que la protéine Mlo de l'orge (*Schulze-Lefert et al., 1997*).

b) *Facteurs d'avirulence interagissant avec les récepteurs kinases*

Dans beaucoup de cas, la protéine encodée par le gène d'avirulence peut servir directement de ligand pour déclencher une réponse de défense chez la plante (Tableau 1). Dans d'autres cas, la protéine d'avirulence possède une séquence signal de transport vers le noyau et pourrait interagir directement avec la transcription des gènes (*Yang et Gabriel, 1995*).

Les facteurs d'avirulence peuvent également encoder des enzymes impliqués dans la biosynthèse des molécules organiques élicitrices tels que les syringolides (exemple : le gène *avrD* de *Pseudomonas syringae* ; **Fig.4** ; Bent, F., 1996).

Certaines protéines d'avirulence sont bien caractérisées telles que la protéine d'enveloppe du virus de la mosaïque du tabac (**Fig.5** ; Taraporewala et al., 1996) et Avr9, un peptide de 28 acides aminés, produit par clivage protéolytique d'une protéine plus grande et produite par *Cladosporium fulvum* (**Fig.6** ; Van kan et al., 1991). On ne connaît cependant pas la protéine de résistance reconnaissant la protéine d'enveloppe du virus de la mosaïque du tabac ; et, on n'a pas pu démontrer qu'Avr9 interagissait directement avec Cf9, la protéine de résistance qui lui est associée. Le tableau 1 montre d'autres facteurs d'avirulence et le facteur de résistance associé.

Malgré ces quelques exemples, il subsiste encore beaucoup de facteurs d'avirulence non identifiés malgré la connaissance de nombreux gènes de résistance.

Le mode d'action des protéines d'avirulence est différent suivant leur localisation dans la cellule :

- Cas d'une protéine d'avirulence intracellulaire (**Fig.7**)

La protéine *avrPto* de *Pseudomonas syringae* est injectée dans le cytoplasme et interagit avec la protéine de résistance *Pto*. L'injection de *avrPto* dans le cytoplasme est réalisée par un appareil de sécrétion de type III constitué de plusieurs protéines encodées par la bactérie (Alfano et al., 1996). Le mécanisme par lequel la reconnaissance induit la transduction du signal est bien caractérisé : la fixation de *avrPto* sur *Pto* induit la phosphorylation de ce dernier grâce au facteur *Prf*. Lorsque *Pto* est phosphorylé, il se détache du complexe *Prf-avrPto* et active différents facteurs *Pti* impliqués dans la réaction hypersensible (*Pti1*) et l'activation de la transcription des protéines PR (*Pti 4* à *Pti6*).

- Cas d'une protéine d'avirulence extracellulaire (**Fig.8**)

Avr9 est une protéine d'avirulence encodée par *Cladosporium fulvum* interagissant avec la protéine de résistance Cf-9 de la tomate. Le gène Cf-9 encode un récepteur transmembranaire impliqué dans la fixation de Avr9 à l'extérieur de la cellule. La reconnaissance induit l'activation de la réponse de défense. Trois hypothèses sont proposées pour expliquer comment l'interaction Avr9 et Cf-9 pourrait déclencher les

réponses de défenses : premièrement, la protéine d'avirulence Avr9 interagirait directement avec le récepteur Cf-9 ; deuxièmement, l'interaction Avr9/Cf-9 nécessiterait une protéine de liaison encodée par l'hôte ; ou troisièmement, la fixation de Avr9 par Cf-9 induirait l'hétérodimérisation avec une 2^{ème} protéine transmembranaire, ce qui activerait la cascade de transduction du signal.

Les pathogènes sont également capables de contourner une réponse de défense de la plante en modifiant la structure de leurs protéines d'avirulence. Le changement d'un acide aminé dans la protéine d'enveloppe du virus de la mosaïque du tabac résulte en une perte de l'avirulence (*Taraporewala et al., 1996*). De même, des modifications du nombre de répétitions d'un motif de 34 acides aminés dans la protéine avrBs3 de *Xanthomonas campestris* entraînent une perte de la reconnaissance de la protéine par le facteur de résistance associé Bs3 mais génèrent aussi de nouveaux gènes d'avirulence capables de réagir avec les allèles récessifs de Bs3 (**Fig9** ; *Herbers et al, 1992* ; *Buchanan, Gruissem and Jones, 2000*).

Des réarrangements géniques, des transpositions, des délétions ou la perte de plasmides dans le cas des bactéries sont à la base de ces modifications.

Des événements similaires sont aussi observés chez les plantes (*Mc Dowell et al., 1998*) qui peuvent modifier la spécificité de leurs récepteurs pour reconnaître de nouveaux pathogènes. Plantes et pathogènes subissent ainsi un phénomène de co-évolution.

4. Mécanismes de protection de la plante

La résistance de la plante est corrélée avec l'activation d'une série de mécanismes de défense afin de détruire ou de limiter la progression du pathogène. Ces mécanismes peuvent être classés en trois catégories en fonction de leur activation chronologique : production de dérivés actifs de l'oxygène, production de NO, production de phytoalexines, synthèse de protéines PR, accumulation d'acide salicylique, synthèse de méthyljasmonate et d'éthylène, renforcement de la paroi cellulaire.

La résistance de la plante vis-à-vis d'un pathogène se manifeste par l'apparition de zones nécrotiques confinées et composées de cellules végétales mortes. Ces cellules ne sont pas tuées par le pathogène mais subissent une mort cellulaire programmée. Cette réponse, comparable au choc oxydatif et à l'apoptose des cellules animales, est appelée « réaction hypersensible » (HR) chez les végétaux.

Bien que cette réponse présente des caractéristiques proches de l'apoptose des cellules animales (fragmentation de l'ADN, formation de corps apoptotiques et dysfonctionnements mitochondriaux), les gènes impliqués dans l'apoptose animale n'ont pas d'équivalents chez les plantes. Cette observation suggère une conservation de fonctions assortie d'une divergence dans les « acteurs moléculaires » impliqués (*Dangl et al., 1996*).

La réponse hypersensible peut causer l'arrêt de la progression du pathogène de différentes manières :

- Soit le pathogène est intracellulaire et la mort cellulaire fait que celui-ci ne peut plus se multiplier par privation de nutriments et isolement.
- Soit le pathogène est extracellulaire et la réponse hypersensible assure la libération de substances toxiques contenues dans la vacuole. Beaucoup de métabolites secondaires à action antimicrobienne ainsi que des enzymes hydrolytiques sont, en effet, stockés sous formes de précurseurs (ex. saponines, glycosinolates, glucanases, chitinases,...) dans les cellules saines et libérés, et/ou activés, lors d'une agression pathogène (*Osborn et al., 1996*).

Bien que la réponse hypersensible soit couramment utilisée comme moyen de défense par la plante, certains pathogènes peuvent échapper à celle-ci. La paroi de certaines bactéries ou champignons est parfois suffisamment développée que pour protéger ces microorganismes contre les substances nocives produites par la plante (*Knogge et al., 1996*). D'autres espèces bactériennes telles que *Erwinia carotovora* retardent l'invasion de la plante jusqu'au moment

où la population bactérienne est suffisamment grande pour contourner la réponse hypersensible (effet de masse ; *Mae et al.*, 2001).

Dans les paragraphes suivants, nous allons passer en revue les différentes étapes moléculaires qui peuvent être identifiées au cours de la réponse hypersensible (**fig.10**) : production de dérivés actifs de l'oxygène, production de NO, production de phytoalexines, synthèse de protéines PR, accumulation d'acide salicylique, synthèse de méthyljasmonate et d'éthylène ainsi que le renforcement de la paroi cellulaire.

a) Production de dérivés actifs de l'oxygène

La production de dérivés actifs de l'oxygène au sein de la paroi végétale joue un rôle clef dans les réponses de défense chez les végétaux. C'est une des premières réponses observées lors d'une attaque pathogène (5 minutes) et est comparable au choc oxydatif des cellules animales.

Le premier dérivé actif de l'oxygène produit est l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ par une NADPH-Oxydase membranaire analogue à celle rencontrée dans les neutrophiles chez les mammifères. Celle-ci est d'ailleurs inhibée par les mêmes modulateurs que ceux agissant sur l'enzyme animale tels que le diphényleniodonium (**Fig11** ; *Murphy et al.*, 1996). Les radicaux $O_2^{\circ-}$ peuvent également être produits par une peroxydase pariétale en présence de Mn^{++} et de monophénols. La contribution des différents mécanismes de production varie en fonction du type de pathogène et de l'espèce de plante.

L'anion superoxyde est rapidement dismuté en peroxyde d'hydrogène spontanément ou par l'action de la superoxyde dismutase (**Fig12**). A pH acide, notamment au niveau de la paroi cellulaire, l' $O_2^{\circ-}$ est transformé en radical hydroperoxyde (HO_2°) et ce dernier possède la faculté de réagir avec les acides gras membranaires pour former des peroxydes lipidiques (**Fig12**). En présence de Fe^{++} , le peroxyde d'hydrogène subit la réaction de Fenton avec production du radical hydroxyle (OH°) qui est le dérivé de l'oxygène le plus réactionnel (**Fig12**). Ce dernier peut également provoquer une peroxydation lipidique mais aussi fragmenter l'ADN en s'attaquant à des sites spécifiques.

L'accumulation de ces dérivés actifs de l'oxygène dans la paroi est bénéfique à plusieurs niveaux (**Fig11**):

1. Ceux-ci peuvent s'attaquer directement au pathogène à des concentrations observées dans la paroi au cours de la réponse de défense.
2. Ils contribuent au renforcement de la paroi cellulaire puisqu'ils sont indispensables à la formation des précurseurs de la lignine via l'action des peroxydases (*Brisson et al.*,

1994) et à la réticulation des protéines HRGP's (hydroxyproline rich glycoproteins) pariétales.

3. Ils favorisent la peroxydation lipidique et la production de méthyljasmonate.
4. Le peroxyde d'hydrogène formé dans la paroi peut également entrer dans les cellules où il exercera une action de messenger secondaire (*Medhy et al., 1994*). Son accumulation dans les cellules est favorisée par l'inhibition des catalases (*Levin et al., 1994*). Dans les cellules, il active la benzoate hydroxylase, une enzyme clef dans la synthèse d'acide salicylique (*Leon et al., 1995*) et il induit des mécanismes de détoxification dans les cellules adjacentes au site d'infection tels que l'expression de la glutathion S-transferase, l'ascorbate peroxydase et la glutathion peroxydase (limitation de l'étendue des zones de nécrose). Il modifie également l'équilibre redox des cellules ce qui peut, d'une part, influencer la stabilité des messagers spécifiques des protéines de défense et, d'autre part, permettre l'activation des facteurs de transcription sensibles au potentiel redox des cellules (*Medhy et al., 1994*).

L'importance des dérivés de l'oxygène a été prouvée par l'analyse de mutants dits « lesion-mimic » qui expriment de façon constitutive des protéines de défense sans pour autant être attaqués par un pathogène. Ces plantes mutantes produisent de l' $O_2^{\bullet-}$ et de l' H_2O_2 de façon constitutive suggérant le rôle important de ces composés dans la coordination des réponses de défense chez les plantes (*Ryals et al., 1995*).

b) Production d'oxyde nitrique (NO)

Le NO est une molécule signalétique impliquée dans divers processus immunitaires, nerveux et vasculaires chez les mammifères. La production de NO par les cellules végétales infectées a également été mise en évidence récemment.

Dans le cadre des interactions plantes-pathogènes, il semblerait que le NO accentue l'effet des radicaux libres sur la mort cellulaire programmée. En effet, des plantes traitées avec des inhibiteurs du NO ne déclenchent plus la réponse hypersensible et sont agressées par les pathogènes sans moyens de répondre efficacement (*Stamler et Hansladen, 1998*). Le NO, en se fixant sur l'hème inhiberait l'action des catalases et de l'ascorbate peroxydase, favoriserait ainsi l'accumulation des dérivés actifs de l'oxygène et le déclenchement de la réponse hypersensible.

Le NO a également un rôle sur l'augmentation du taux de transcription des gènes encodant les protéines PR et favorise l'accumulation d'acide salicylique (*Buchanan, Grisse et Jones, 2000 ; Dangl et al., 2000*).

La principale source de NO chez les plantes sont les peroxysomes, qui produisent également des dérivés actifs de l'oxygène. Le NO peut réagir avec le radical O_2^{\bullet} pour former du peroxy-nitrile, un oxydant très puissant impliqué dans l'apoptose chez les animaux et la réaction hypersensible chez les végétaux (**fig.13**, *Francisco et al., 2001*).

c) Synthèse de phytoalexines

Les phytoalexines sont des molécules à action antimicrobienne et dérivées du métabolisme secondaire mis en place suite à une attaque par un pathogène.

Bien que différentes voies métaboliques sont impliquées dans la production de phytoalexines, la voie des phénylpropanoïdes, dont l'enzyme clef est la PAL (phenylalanine ammonia lyase), occupe une place centrale dans leur production. En effet, on a montré que des plantes transformées dont l'expression de la PAL a été supprimée par cosuppression présentent des lésions plus importantes vis-à-vis du TMV que des plantes sauvages, ce qui montre l'importance des phytoalexines dans la réponse de défense (*Pallas et al, 1996*).

La production de phytoalexines induit généralement la mort des cellules végétales qui entament leur synthèse (cfr mort cellulaire programmée) mais ces composés peuvent, dans certains cas, être excrétés sous forme conjuguée dans la paroi et agir de façon extracellulaire (*Walbot et al., 1997*).

d) Production de protéines PR

Plusieurs protéines pariétales agissent également pour bloquer la progression des microorganismes. Parmi celles-ci on retrouve les protéines dites PR (pathogenesis-related protein). Les protéines PR sont des protéines de défenses qui s'accumulent endéans quelques minutes à quelques heures après l'infection (*Callow, J.A., 1995*). Il existe plus de 14 classes de protéines PR reprises dans le tableau 2.

Parmi les mieux caractérisées, on trouve les protéines PR-2 et PR-3 qui correspondent à des glucanases et des chitinases respectivement. Ces enzymes détruisent la paroi des envahisseurs fongiques et bactériens et produisent des éliciteurs. La synthèse de ces protéines est, entre autres, induite par l'acide salicylique (*Klessig et al., 1994*).

D'autres classes de protéines PR telles que les lipoxygénases contribuent à la production de messagers secondaires tels que le méthyljasmonate. Un autre type de protéine PR regroupe les défensines, des protéines de faible poids moléculaire (7 kda) riches en cystéines. Leur synthèse est induite par l'acide salicylique et l'acide jasmonique (*Ryan et al., 2000*).

Enfin, les PGIP's (polygalacturonase inhibiting proteins), qui présentent un motif LRR, inhibent les polygalacturonases produites par le pathogène qui assurent normalement la destruction de la paroi (*Bent et al., 1996*). Les PGIP's favorisent ainsi l'accumulation de fragments pectiques ayant un degré de polymérisation >9 dont la fonction signalétique est très importante au sein de la paroi végétale (**Fig.14** ; *Farmer et al., 1992* ; *Messiaen et van Cutsem, 1993 et 1994*).

e) Production d'acide salicylique et « vaccination » de la plante

L'acide salicylique est une molécule dérivée de la voie des phénylpropanoïdes dont la synthèse peut-être induite, entre autres, par le peroxyde d'hydrogène. L'acide salicylique existe sous deux formes dans les cellules : libre ou conjuguée (esters de glucose si la conjugaison se fait via le groupement carboxyle ou glucoside si elle se fait via le groupement hydroxyle). L'acide salicylique produit suite à une infection est lié à du glucose pour former du glucoside (SAG) ce qui protège l'acide de la dégradation et permet de constituer des réserves intracellulaires rapidement mobilisables en cas de 2^{ème} infection (**fig.15**, *Klessig et al., 1994*). Un autre dérivé de l'acide salicylique, le méthylsalicylate, peut également être produit en cas d'attaque par un pathogène. Ce composé volatile active la synthèse d'acide salicylique dans toute la plante et permet l'accumulation de protéine PR.

Le rôle de l'acide salicylique est d'induire, en coordination avec d'autres molécules-signal, la mise en place de réponses défensives aussi bien dans les cellules en contact avec la zone nécrotique que dans toute la plante (réponse « SAR » ou systemic acquired resistance). Les zones nécrotiques résultant de la réponse hypersensible, et se trouvant aux alentours du point de pénétration du pathogène, semblent être un mal nécessaire pour assurer la « vaccination » de la plante. Un signal mobile est produit en réponse à une infection primaire et est transmis dans la plante entière pour assurer une résistance systémique efficace contre toute infection secondaire de la plante par le même pathogène ou par un autre pathogène.

L'importance de l'acide salicylique dans l'établissement de la réponse « SAR » a été démontrée en transformant des plantes avec le gène de la salicylate hydroxylase (*NahG*), un gène isolé de la bactérie *Pseudomonas putida*, qui convertit l'acide salicylique en catéchol et empêche l'action de celui-ci (**Fig.16**). La plupart des plantes *NahG*, dépourvues d'acide

salicylique, présentent une résistance systémique bien moins importante que les plantes sauvages (*Ryals et al., 1996*). Dans d'autres cas, la présence du gène de la salicylate hydroxylase ne compromet pas la résistance de la plante face au pathogène (*Jones et al., 1996*). Le rôle de l'acide salicylique est, en effet, complexe et peut varier d'espèces à espèces puisque chez le riz, on n'observe pas d'augmentation du taux d'acide salicylique dans les cellules lors d'une attaque mais celui-ci contribue néanmoins à la réponse SAR (*Silverman et al., 1995*). A l'heure actuelle, on considère que l'acide salicylique n'est pas le signal agissant à distance dans la réponse SAR, mais que sa présence est nécessaire pour que la réponse SAR puisse se développer.

Outre l'importance de l'acide salicylique dans le développement de la réponse SAR, il induit également la production de différentes protéines PR. Le promoteur des gènes PR contient des éléments CIS sensibles à l'acide salicylique : CTGACGTAAGGGATGACGCAC, sur lesquels viennent se fixer des facteurs de transcription PRB (*Klessig et al., 1996*). L'activation de ces facteurs de transcription nécessite l'intervention de la voie des MAPKinase et de la protéine NIM1 présentant une forte homologie avec le facteur IκB des cellules animales (**Fig.23** ; *Ryals et al., 1997*).

f) Production de méthyljasmonate (MJ)

Le MJ est un composé volatile qui possède une fonction de coordination importante de différentes réponses physiologiques telles que la germination des graines, la croissance, le stockage des protéines, la photosynthèse, le floraison, le développement des fruits et les stress, dont l'agression pathogène (*Buchanan et al., 2000*).

C'est une molécule dérivée de l'acide linoléique et possédant une structure analogue aux prostaglandines des mammifères. La synthèse de méthyljasmonate peut également être induite par la production d'H₂O₂ au niveau de la paroi. Le peroxyde d'hydrogène génère, en effet, des peroxydes lipidiques davantage sensibles à l'action de la PLA₂ et de la lipoxygénase, les deux premières enzymes de la voie de biosynthèse (*Buchanan et al., 2000* ; **Fig.17**).

La voie de transduction du MJ est encore assez mal connue, mais l'activation de la PLA₂ semble impliquer des MAPKinases. Au niveau transcriptionnel, le méthyljasmonate active des gènes contrôlant la synthèse des protéines à action antifongique, la production de phytoalexines ainsi que l'accumulation d'inhibiteurs de protéases (*Dangl et al., 2000*).

Le MJ induit également la synthèse de systémine, un peptide de 18 acides aminés issu du clivage de la prosystémine, une protéine encodée par un gène contenant onze exons répartis sur 4186 pb (**Fig.18**). La systémine est un candidat potentiel pour être le signal « SAR » (systemic

acquired resistance) qui est un signal de « vaccination » de la plante. Elle a, en effet, été détectée dans le phloème et son accumulation systémique induit la synthèse d'inhibiteurs de protéases dans la plante entière. Sa libération n'a cependant pu être mise en évidence que dans le cas d'attaques par un insecte phytophage, ce qui suggère l'existence d'autres signaux mobiles sur de grandes distances libérés en cas d'attaques par d'autres pathogènes tels que des bactéries, des champignons et des virus (*Ryan et al., 2000*). Le méthyljasmonate et l'éthylène sont des messagers produits en cas d'attaques par des pathogènes nécrotrophes et semblent activer la résistance par une voie différente de celle activée par l'acide salicylique qui est produit si la plante est attaquée par un pathogène biotrophique (Fig.19 ; *Thomma et al., 1998*).

g) Renforcement de la paroi cellulaire

Le renforcement de la paroi fait intervenir deux types de polymères :

- La callose, un polymère de β -1,3-glucane
- La lignine, un polymère complexe de composés phénoliques

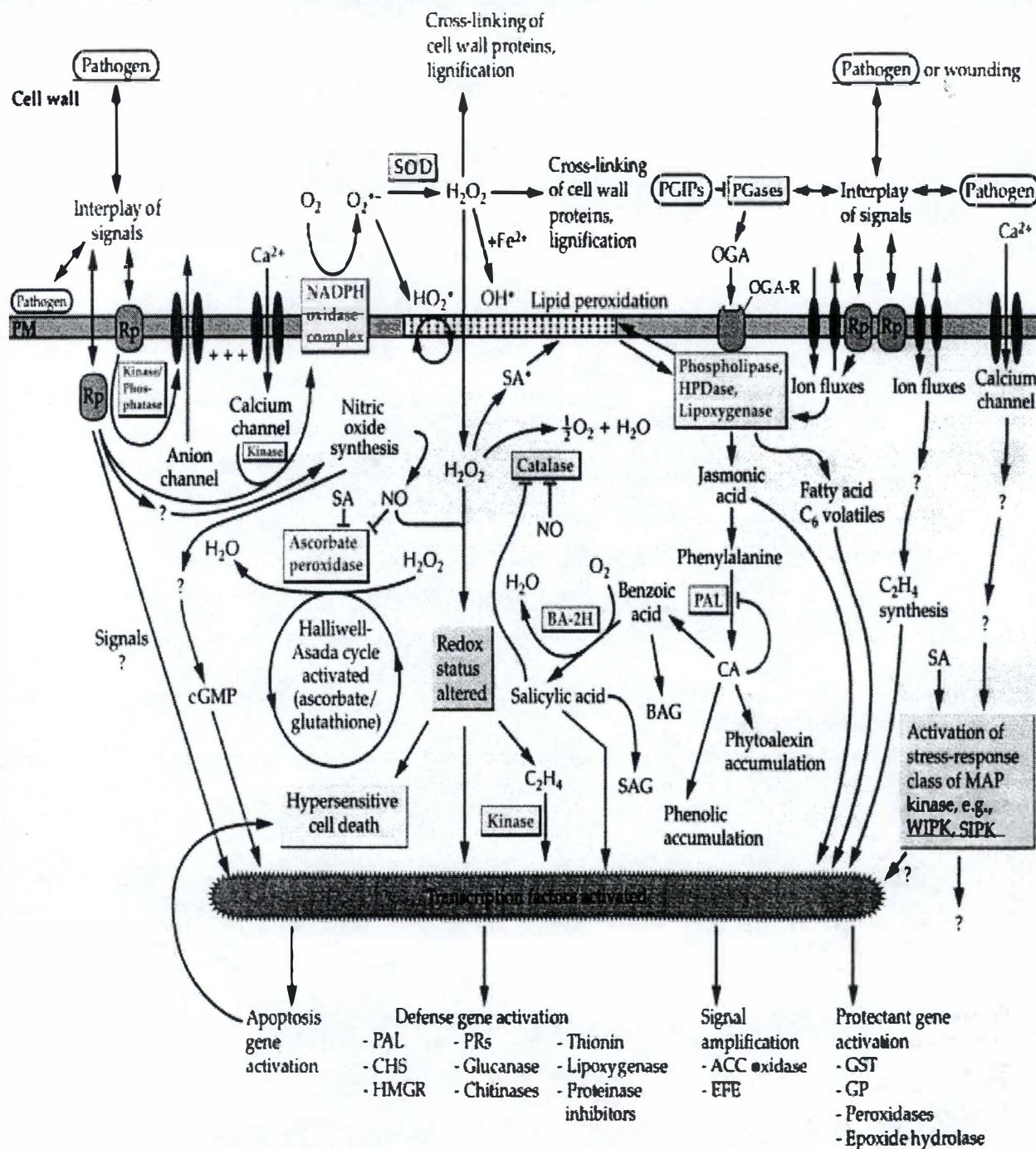
Ceux-ci interviennent pour limiter la progression du pathogène via la paroi végétale mais également la progression des virus au travers des plasmodesmes dans le cas de la callose (*Beffa et al., 1996*).

Des protéines de la paroi, les HRGP's (Hydroxy proline-rich glycoproteins) , interviennent également dans le renforcement de la paroi végétale :

- Les HRGP's constitutives se lient rapidement par l'intermédiaire des résidus tyrosines. Cette réaction est catalysée par le peroxyde d'hydrogène produit au niveau de la paroi.
- Les HRGP's synthétisées *de novo* initient la polymérisation de la lignine (*Showalter et al., 1995*).

Schéma récapitulatif des principaux événements cellulaires cités dans les pages précédentes et mis en place par les végétaux lors d'une attaque pathogène.

Abréviations : ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid ; BAG, benzoic acid glucoside ; BA-2H,



benzoic acid-2 hydroxylase ; CA, cinnamic acid ; cGMP, cyclic guanosine 5'-monophosphate ; CHS, chalcone synthase ; EFE, ethylene-forming enzyme ; GP, glutathione peroxidase ; GST, glutathione S-transferase ; HMGR, 3'-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase ; HO₂[•], hydroperoxyl radical ; HPDase, hydroperoxide dehydratase ; MAP, mitogen-activating protein ; NO, nitric oxide ; OH[•], hydroxyl radical ; OGA and OGA-R, oligogalacturonide fragments and receptor ; PAL, phenylalanine ammonia lyase ; PGases, polygalacturonases ; PM, plasma membrane ; SA[•], salicylic acid radical ; SAG, salicylic acid glucoside ; SIPK, salicylic acid-induced protein kinase ; WIPK, wound-induced protein kinase

5. Autres récepteurs kinases des végétaux

Outre les récepteurs impliqués dans les réactions de défense, la plante possède d'autres récepteurs qui, pour la plupart appartiennent à la famille de récepteurs à sérine/thréonine kinase. Ceux-ci régulent de réponses physiologiques aussi diverses que la perception des phytohormones et de la lumière, la reconnaissance du soi et le développement des méristèmes (Walker et Braun, 1996).

On ne connaît pour le moment qu'un seul récepteur de type tyrosine kinase : PRK1 qui est un récepteur avec une spécificité duale pour les sérine/thréonine ou les tyrosines (Kao et al., 1994). Cette situation contraste avec ce que l'on trouve chez les animaux où les récepteurs impliqués dans le développement sont tous de type tyrosine kinase à l'exception du récepteur au TGF β . On trouve également chez les plantes des récepteurs de type histidine kinase dérivé du système de transduction du signal à deux composantes trouvés chez les bactéries et les levures.

a) Récepteurs sérine-thréonine kinase associés à la paroi : les protéines WAK

Les protéines WAK seraient impliquées dans la transduction des informations de la paroi vers le cytoplasme. Cette fonction est déduite de leur structure particulière. Celles-ci possèdent, en effet, un domaine extracellulaire intimement associé aux constituants de la paroi et un domaine sérine-thréonine kinase cytosolique. Ces protéines seraient ainsi les analogues au système d'intégrines présent chez les animaux et assurant l'interaction avec la matrice extracellulaire.

Il existe cinq isoformes des protéines WAK regroupées en un cluster de 30 kb sur le chromosome 1 d'*Arabidopsis thaliana* (Fig.20). Les domaines kinases présentent plus de 90% de similarités tandis que les domaines extracellulaires sont spécifiques d'une isoforme (Fig.21). Les isoformes 1 et 2 sont exprimées dans tous les tissus de la plante ; les isoformes 3 et 5 dans les feuilles et les tiges ; et, l'isoforme 4 uniquement dans les siliques. On trouve dans le domaine extracellulaire des répétitions de motifs homologues à des motifs trouvés dans des protéines de la matrice extracellulaire des animaux (Fig.22) telles que la neurexine, la tenascine, l'EGF ou le collagène (Kohorn et al, 1999). La présence de tels domaines suggère que les WAK pourraient donc intervenir aussi dans l'interaction protéine-protéine. A ce titre, on a mis en évidence récemment par la technique du double hybride que AtGRP3 (glycine-rich extracellular protein), une protéine pariétale, pouvait se lier au domaine extracellulaire de WAK1. Le rôle des protéines riches en glycine de la paroi est inconnu. *In vivo*, WAK1 et

AtGRP3 forment un complexe de 500 kDa en conjonction avec la protéine KAPP (kinase associated protein phosphatase). Cette dernière interagit avec de nombreux récepteurs kinases dont le récepteur aux brassinostéroïdes (cfr 5.b) et CLAVATA1 (5.b). L'expression d'AtGRP3 est également induite par l'acide salicylique et il semblerait que cette protéine puisse réguler la protéine WAK1. L'addition exogène de la protéine AtGRP3 active la transcription de *wak1* ainsi que celle du gène *PR-1* (Park et al., 2001).

WAK1 est l'isoforme qui est induite durant une attaque par un pathogène ou quand l'attaque est simulée par de l'acide salicylique exogène. Cette induction de WAK1 requiert le régulateur positif NPR1/NIM1 également impliqué dans l'induction d'autres protéines PR (Fig.23). A ce titre, WAK1 peut être considéré comme une protéine PR. Pour rappel, ce régulateur présente de fortes analogies avec I κ B qui contrôle le facteur de transcription NF κ B chez les cellules animales. Une mutation homozygote de NPR1 entraîne une expression beaucoup plus réduite de WAK1. L'induction de l'expression de WAK1 est aussi indispensable pour que la plante puisse survivre à une concentration élevée en acide salicylique. L'expression ectopique de la protéine confère d'ailleurs la résistance à des concentrations en acide salicylique qui seraient léthales en temps normal (Kohorn et al., 1998).

b) Récepteurs kinase et développement

i. BRI1, le récepteur des brassinostéroïdes

On a mis en évidence dans les années 70' que des extraits de pollen de *Brassica napus* induisaient une élongation rapide des entre-nœuds différente de celle induite par les gibbérélines. Cette observation a contribué à la découverte d'un régulateur de croissance de type stéroïde : le brassinolide.

Depuis, une quarantaine de composés apparentés ont été découverts et sont regroupés sous le terme générique de brassinostéroïdes (BR ; fig.24). Ceux-ci sont synthétisés au départ de campestérol et leur squelette carboné est le même que celui du cholestérol. Les effets biologiques des BR concernent essentiellement la morphologie des cellules et incluent l'élongation de la tige, la croissance du tube pollinique, la réorientation des fibres de cellulose, l'activation des pompes à protons, la xylogénèse et l'augmentation de la synthèse d'éthylène (Yokota et al., 1997).

Comme toutes les hormones végétales, le rôle des brassinostéroïdes a été mis en évidence grâce à l'existence de mutants. Les mutants Dwarfs d'*Arabidopsis thaliana* sont d'un intérêt tout particulier. Ces plantes ont une taille très réduite par rapport aux plantes sauvages et le

phénotype est typique d'un trouble dans la synthèse ou la perception des BR (*Schumaker et Chory, 2000*). Ces mutants présentent des mutations au niveau des gènes encodant les enzymes impliqués dans la biosynthèse des BR. Un mutant particulier, le mutant *BR11* d'*Arabidopsis thaliana*, semble, quant à lui, être un mutant dont le récepteur aux BR a été muté car il est insensible aux additions de BR exogènes. Ce mutant présente tous les troubles typiques d'une plante dont la perception des BR est perturbée : nanisme, stérilité mâle,...(*Li et Chory, 1997*).

La protéine encodée par *BR11* est un récepteur kinase présentant de nombreuses répétitions LRR's similaires à celles trouvées dans les protéines de résistance. Le domaine extra-cellulaire N-terminal contient un domaine de type leucine zipper suggérant la formation d'homo- ou d'hétérodimères. Cette zone est suivie par 25 LRR's et un domaine de 70 acides aminés compris entre les LRR's 21 et 22. Le reste de la protéine est formé par un domaine transmembraire et un domaine sérine/thréonine kinase cytoplasmique (*Chory et al., 2000*). Vu cette structure, on pense que *BR11* est un récepteur de surface qui transduit le signal des BR vers l'intérieur de la cellule.

Il existe 3 modèles de fonctionnement de *BR11* :

1. *BR11* serait capable de lier directement les BR via le domaine de 70 acides aminés compris entre les LRR's 21 et 22. Le rôle capital de cette région est suggéré par le fait que la plupart des mutations observées se trouvent dans cette zone de la protéine. Les domaines LRR's, quant à eux, ne seraient pas capables de lier des molécules de type stéroïde et interviendraient plutôt dans les interactions protéine-protéine. Deux modes de fonctionnement sont proposés : soit le récepteur existe déjà sous forme homodimérique et la liaison du ligand induit l'activité kinase intracellulaire ; soit le récepteur est monomérique et la fixation du ligand induit l'homodimérisation en plus d'activer l'activité kinase intracellulaire (**Fig.25a**, *Chory et al., 2000*).
2. Le 2^{ème} modèle suppose l'intervention d'une protéine de liaison des BR. Cette hypothèse est intéressante car on a mis en évidence, chez *Arabidopsis thaliana*, une protéine similaire aux protéines de fixation des stéroïdes chez les animaux. Celle-ci pourrait interagir avec le récepteur *BR11* pour former un complexe tertiaire. Dans ce modèle, *BR11* ne lierait pas directement les BR mais subirait néanmoins une homodimérisation (**Fig.25b**, *Chory et al., 2000*).
3. Dans le 3^{ème} modèle, *BR11* est une des 2 sous-unités d'un récepteur formé par une autre kinase de type LRR ou une autre protéine encore inconnues. La fixation du

ligand induirait une hétérodimérisation et déclencherait l'activité kinase de BRI1 (**Fig.25c**, Chory et al., 2000).

La spécificité de ce système de transduction ne semblerait pas venir de BRI1 qui est exprimé de façon très ubiquiste dans la plante, mais des partenaires du récepteur dont l'expression est contrôlée d'un point de vue spatio-temporel (Schumaker et Chory, 2000).

ii. *Le récepteur SRK et l'incompatibilité pollinique*

Il existe une série de mécanismes susceptibles d'empêcher le développement du grain de pollen lors de son arrivée sur l'ovaire si les conditions ne sont pas optimales. Un de ces mécanismes est l'arrêt de la croissance du tube pollinique lorsque les plantes sont génétiquement trop proches. Ce type d'incompatibilité, appelé « auto-incompatibilité » (SI), est un mécanisme de reconnaissance du soi. Un grain de pollen ne pourra pas se développer sur le stigmate d'une fleur de la même plante, alors qu'il le pourra sur le stigmate d'une fleur d'une autre plante de la même espèce. Ce mécanisme a pour but de favoriser les croisements et d'élargir la diversité génétique d'une espèce.

L'auto-incompatibilité peut-être de 2 types : gaméophytique ou sporophytique. Au cours de l'incompatibilité gaméophytique, la réussite de la fécondation est déterminée par le génotype haploïde du grain de pollen. Si l'allèle S porté par celui-ci est reconnu par un produit des allèles S portés par le stigmate diploïde, la croissance du tube pollinique sera avortée et la fécondation n'aura pas lieu. En d'autres mots, l'allèle S du grain de pollen ne peut pas être identique à celui porté par le stigmate (Rothstein et al., 2000 ; **Fig.26a**).

Dans le cas d'une incompatibilité sporophytique, l'incompatibilité est déterminée par le génotype diploïde de la plante de laquelle le grain de pollen est issu. Dans ce cas, deux marqueurs S interviennent et aucun des deux ne peut être identique à ceux portés par le stigmate (**Fig.26b**).

Dans les deux cas, l'avortement de la fécondation se traduit par une non-hydratation du grain de pollen empêchant toute croissance pollinique.

Les récepteurs impliqués dans l'incompatibilité pollinique chez les végétaux appartiennent au groupe appelé « S-domain RLK » (Récepteurs kinase à domaine S). Ils possèdent tous un domaine similaire au locus S des glycoprotéines impliquées dans le contrôle de l'incompatibilité pollinique chez *Brassica napus*, la première espèce où ce phénomène a été décrit (Rothstein et al., 2000).

Deux types de gènes sont impliqués dans le mécanisme d'incompatibilité : le premier détermine la spécificité du « mâle » tandis que le deuxième la spécificité de la « femelle » :

1. Déterminants femelles de l'incompatibilité

On connaît 2 classes de gènes intervenant au niveau des organes reproducteurs femelles : SLG (S locus glycoprotéine) et SRK (S récepteur kinase). Le polymorphisme très important de ces deux gènes détermine la spécificité de l'haplotype S. Les protéines encodées par SLG et SRK ne sont détectées qu'au niveau des stigmates (*Rothstein et al., 2000*). SLG encode une protéine pariétale très abondante tandis que SRK encode un récepteur kinase possédant un domaine S (appelé aussi domaine SLG-like vu sa similarité avec SLG), un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique sérine/thréonine kinase (*Rothstein et al., 1992*).

Plusieurs expériences ont démontré l'importance de ces protéines dans l'incompatibilité pollinique. Par exemple, le silencing de SLG ou SRK induit par un transgène mène à une perte de l'incompatibilité (*Conner et al., 1997*).

2. Déterminants mâles de l'incompatibilité

La présence de SRK sur les organes femelles a conduit à penser que le déterminant mâle de l'incompatibilité était une protéine ligand du récepteur et présente au niveau de la paroi du grain de pollen. Celle-ci devait être polymorphe et anthère-spécifique. Des bio-essais ont permis de découvrir le déterminant mâle comme étant une protéine riche en cystéines, très polymorphe et se fixant sur SLG. Cette protéine a été appelée SCR (S-locus cystein rich, *Stephenson et al., 1997*). Le gène *SCR* est localisé au niveau du locus comprenant les gènes SLG et SRK. On a identifié 21 allèles SCR jusqu'à présent (*Schopfer et al., 1999*).

Une fois les différents acteurs de l'incompatibilité mis en évidence, on a pu proposer un modèle de fonctionnement :

Lorsque le stigmate d'une fleur reçoit un grain de pollen de la même plante, la protéine SCR du grain de pollen diffuse vers la paroi des cellules du stigmate et se lie sur le domaine récepteur de la protéine SRK. Il en résulte un changement de conformation du récepteur qui induit l'activité kinase de la protéine et la phosphorylation de substrats cellulaires menant à la fermeture des aquaporines membranaires et à la déshydratation du tissu sur lequel le grain de pollen aurait dû se développer normalement. Le rôle de SLG dans ce modèle est de transporter SCR vers SRK ou de se fixer au complexe SCR-SRK afin de potentialiser la réponse

(Buchanan, Gruissem and Jones, 2000 ; Fig27). Des substrats intracellulaires potentiels de SRK ont été identifiés par la technique du double hybride. Une de ces protéines, Arc1 (Arm-repeat containing 1), est exprimée de façon spécifique dans le stigmate et est phosphorylée lorsqu'elle se lie à SRK (Rothstein et al., 2000).

iii. Le récepteur CLAVATA et la formation des méristèmes

Chez les plantes, les divisions cellulaires durant le développement végétatif sont restreintes aux zones méristématiques. La particularité d'un méristème est qu'il doit assurer son propre maintien, d'une part, et la formation des organes, d'autres part.

CLAVATA 1 encode un récepteur kinase de 980 acides aminés intervenant dans le contrôle de la différenciation cellulaire assurant la formation des organes au départ des méristèmes. Le domaine extracellulaire contient 21 LRR's et le domaine cytoplasmique est de type sérine/thréonine kinase. La séquence de ce dernier indique que *CLAVATA 1* autophosphoryle uniquement les résidus sérines. L'expression de *CLAVATA 1* est localisée dans la zone centrale du méristème (Becraft et al., 1998). Les plantes possédant un allèle mutant du gène présentent des méristèmes apicaux constitués d'un amas de cellules indifférenciées qui s'accumulent.

Un autre gène, *CLAVATA 3*, présente un phénotype mutant semblable à celui de *CLAVATA 1* indiquant que les deux gènes sont impliqués dans un même processus (Becraft et al., 1998). *CLAVATA 3* code en fait pour une protéine ligand de *CLAVATA 1*. Enfin, un 3^{ème} gène fonctionne en synergie avec les 2 précités : *SHOOT MERISTEM LESS*. Celui-ci a une action antagoniste à *CLAVATA 1* et agit positivement sur la prolifération cellulaire et la restriction de la différenciation. Le juste équilibre entre les fonctions de *CLAVATA 1* et de *SHOOT MERISTEM LESS* est nécessaire pour que les méristèmes puissent assumer leur rôle (Meyerowitz et al., 1996).

Le mode de fonctionnement du complexe *CLAVATA 1-3* n'est pas encore connu à l'heure actuelle. On sait que *CLAVATA 1* interagit avec la protéine KAPP (kinase associated protein phosphatase) connue pour interagir avec d'autres récepteurs kinases tels que BRI1. Cette interaction est dépendante d'une étape de phosphorylation. KAPP agirait comme un régulateur négatif de *CLAVATA 1* car des mutants *clv1* peuvent être sauvés par une diminution du taux de messagers de la protéine KAPP (Clarck et al., 1998).

iv. *Les phytochromes et la photomorphogenèse*

Les plantes sont capables de percevoir la lumière via une série de récepteurs spécifiques : les phytochromes, les récepteurs UV-A et UV-B.

Les phytochromes sont des récepteurs cytosoliques impliqués dans la perception de la lumière rouge qui contrôle plusieurs processus chez les végétaux tels que l'expansion des feuilles, la germination et le rythme circadien de la plante (*Song et al., 1996*).

Il existe 5 types de phytochromes : A, B, C, D et E. Le phytochrome A est le seul à être produit à l'obscurité tandis que les quatre autres sont produits de façon constitutive. La protéine absorbe la lumière rouge grâce à un chromophore constitué d'une molécule tétrapyrrole, la photochromobiline, fixé sur une cystéine du domaine N-terminal de la protéine (**Fig.28a**). Le domaine C-terminal contient la zone kinase de la protéine qui est constituée de deux domaines kinases distincts, TKD1 et 2 (transmitter kinase domain ; **fig.28b**). Le phytochrome A sous forme inactive (Pr) est converti en forme active en présence de lumière rouge (660nm). L'absorption de lumière se traduit par une modification de conformation de la protéine qui active le domaine kinase. Le phytochrome sous sa forme active, appelé Pfr, contrôle les réponses liées à la lumière rouge (**Fig.29**; *Chory et al., 1996*). L'inactivation a lieu en présence de lumière rouge lointain (730nm) ou par protéolyse (*Vierstra et al., 1999*).

Deux modèles de fonctionnement du récepteur sont proposés (*Buchanan, Gruissem and Jones, 2000*) :

- Le premier modèle postule que le phytochrome A serait une sérine kinase capable de phosphoryler, à la fois, un substrat pour initier les réponses contrôlées par la lumière rouge et de s'autophosphoryler pour réduire sa propre activité (**Fig.30a**).
- Le 2^{ème} mécanisme postule que le phytochrome A serait une kinase hybride dans laquelle un résidu histidine conservé est phosphorylé suite à l'absorption de lumière. Le phosphate serait ensuite transféré sur un résidu aspartate d'un substrat afin d'activer celui-ci. Un résidu aspartate du phytochrome A lui-même serait aussi phosphorylé et ce phosphate serait transféré sur une sérine pour diminuer l'activité du récepteur (**Fig.30b**).

c) Récepteurs à histidine kinase

Les récepteurs à histidine kinase les mieux caractérisés chez les plantes sont les récepteurs de l'éthylène, une des cinq hormones végétales avec les auxines, les cytokinines, les gibbéréllines et l'acide abscissique. L'éthylène est impliquée dans une série de processus physiologiques tels que la germination, la floraison, la sénescence des feuilles, le mûrissement des fruits, la détermination du sexe et les réponses aux stress. Comme pour la plupart des hormones végétales, le récepteur de l'éthylène a été mis en évidence grâce à l'existence de mutants de « réponse triple » ou insensibles à l'éthylène.

Des graines mises à germer à l'obscurité en présence d'éthylène présentent un phénotype dit de « réponse triple ». Celui-ci est caractérisé par une inhibition de l'élongation cellulaire, une augmentation de la croissance en largeur et une courbure exacerbée du sommet des plantules. Cette réponse permet à la plante d'être suffisamment vigoureuse pour percer la croûte de terre et atteindre la lumière (**Fig.31**). Les plantes mutantes insensibles à l'éthylène ne présentent pas ce phénotype et sont donc facilement repérables. Plusieurs douzaines de gènes impliqués dans la perception de l'éthylène et dans sa transduction du signal ont ainsi été identifiés chez les mutants de réponse triple (*Buchanan, Grissem and Jones, 2000*).

Cinq gènes codant pour des récepteurs à l'éthylène ont été ainsi découverts chez *Arabidopsis thaliana* : ETR1, ETR2, EIN4, ERS1 et ERS2. Tous codent pour des protéines membranaires similaires au système de transduction du signal à deux composantes de type histidine kinase (*Meyerowitz et al., 1998 a et b*). Ce système est constitué d'un senseur contenant un domaine histidine kinase qui s'autophosphoryle en réponse à un stimulus. Le phosphate porté par l'histidine est ensuite transféré sur un résidu aspartate du transducteur qui initie la voie de transduction du signal (**Fig.32**). Les domaines senseurs et transducteurs sont associés dans une même protéine pour ETR1, ETR2 et EIN4, tandis que ERS1 et ERS2 ne possèdent que le domaine senseur.

ETR1 est le récepteur le mieux caractérisé et forme des homodimères membranaires reliés par un pont disulfure même en absence d'éthylène. Le site de fixation de l'éthylène est localisé au niveau du dernier des trois domaines transmembranaires hydrophobes du récepteur et la fixation requiert du cuivre comme cofacteur. Le domaine cytoplasmique de ETR1 contient le domaine histidine kinase qui s'autophosphoryle lors de la fixation de l'éthylène (*Stepanova et Ecker, 2000*). Le phosphate est ensuite transféré sur un résidu aspartate de la protéine Ctrl agissant comme transducteur (**Fig.33a**). Cette dernière présente de fortes similarités avec le sérine/thréonine kinase Raf, la première enzyme de la voie des MAPKinase chez les cellules

animales, suggérant que la voie de transduction de l'éthylène soit initiée par la voie des MAPKinase.

En absence d'éthylène, Ctr1 est active et inhibe les facteurs de transcription contrôlant les gènes induits par l'éthylène. La fixation du ligand entraîne une inhibition de Ctr1 via phosphorylation et une levée de la répression exercée sur les facteurs de transcription.

Ctr1 contrôle Ein2, une autre protéine transmembranaire dont le rôle n'est pas encore élucidé. En absence d'éthylène, Ctr1 active Ein2 et celle-ci inhibe les protéines agissant en aval. En présence d'éthylène, l'inhibition de Ctr1 entraîne l'inhibition de Ein2 ce qui active les facteurs agissant en aval (**Fig.33b**).

L'inhibition de Ein2 par Ctr1 contrôle l'activité de la protéine Ein3, un facteur de transcription qui se lie au niveau d'une séquence palindromique appelée EBS (ethylen binding site). Cette séquence est retrouvée dans le promoteur du gène ERF1 qui encode un autre facteur de transcription (**Fig.33c**). Ce dernier est une protéine appartenant à la famille des protéines EREBPs (ethylen responsive element binding protein) qui se lie à l'ADN au niveau de « GCC-box », un élément CIS que l'on retrouve dans le promoteur des gènes sensibles à l'éthylène dont certains sont des gènes impliqués dans les réponses aux pathogènes (**Fig.33d** ; *Stepanova et Ecker, 2000*).

II

Objectifs du mémoire

II

Objectifs du mémoire

II Objectifs du mémoire

Le projet du séquençage d'*Arabidopsis thaliana* a permis de mettre en évidence un grand nombre de récepteurs kinases impliqués dans une série de réponses physiologiques (développement, réponse aux pathogènes,...). Parmi ces récepteurs, on trouve les protéines WAK (Wall-Associated kinase) qui sont des protéines associées à la paroi et possédant un domaine kinase cytosolique. Les voies de transduction du signal impliquant les protéines WAK en général, et WAK1 en particulier, sont peu connues.

L'objectif de ce mémoire est d'identifier des intermédiaires de transduction du signal impliqués dans la régulation de la transcription du gène *wak1*, l'isoforme induite durant une attaque par un pathogène, grâce à des modulateurs connus pour agir sur d'autres voies de transduction du signal chez les végétaux.

Dans un premier temps, nous tenterons d'identifier des substances biologiques et des modulateurs de transduction du signal pouvant faire varier les niveaux de transcrits du gène *wak1* chez *Arabidopsis thaliana*. Dans un deuxième temps, une analyse quantitative de la protéine WAK1 nous permettra de mettre en évidence des variations du taux de la protéine WAK1 en réponse à ces mêmes modulateurs.

III

Matériels et Méthodes

III

Matériels et Méthodes

III Matériels et méthodes

1. Matériel

a) Culture d'*Arabidopsis thaliana*

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* (cultivar N1092, Col-0) ont été, dans un premier temps, mises à germer dans un milieu liquide pendant une semaine puis, dans un second temps, transférées sur un milieu solide et cela pour une durée d'une semaine également. Afin de subir différents types de traitements, les plantules ont, par la suite été, incubées en milieu liquide en présence de la substance à étudier et ceci durant la durée des traitements. Les plantules traitées ont été congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'à utilisation (extraction d'ARN ou de protéines).

Le milieu utilisé pour faire la germination, la croissance et l'incubation des plantes est un milieu Murashige et Skoog (MS) dont la composition est la suivante :

- Sucrose 30 gr/litre
- Sels de MS : 4.708 gr/l
- pH 5.8
- Agar pour un milieu solide : 15 gr/l

Les conditions de stérilisation et de germination sont les suivantes :

- Stériliser les graines dans 1 ml d'eau de javel 10 %
- Rincer celles-ci 3 fois dans de l'eau stérile
- Placer une quarantaine de graines dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml de milieu MS
- Placer celui-ci durant une semaine sous agitation à 115 rpm dans une pièce thermostatée à 25°C puis repiquer les plantules.

b) Culture d' *E. coli*

Les bactéries utilisées ont été mises en culture sur le milieu LB dont la composition est la suivante :

- 1 % de bactotryptone
- 0.5 % de yeast extract
- 1 % de NaCl
- pH 7
- 15 gr/l d'agar pour un milieu solide

Les milieux de culture sont autoclavés 120°C à une pression de 1 bar pendant 20 minutes

La sélection des bactéries recombinantes a été réalisée sur un milieu LB contenant de l'ampicilline (200 $\mu\text{g/ml}$). La sélection blanc/bleu a été réalisée sur un milieu LB/Amp contenant 35 μl de X-Gal (Stock : 20 mg/ml) et d'IPTG (Stock : 20 mg/ml).

Les clones bactériens ont été conservés à -80°C dans du milieu LB liquide contenant 15% de glycérol (aliquote de 1 ml). Les clones couramment utilisés ont été conservés à 4°C sur milieu LB solide.

c) Liste des substances pharmacologiques et modulateurs utilisés

- Acide salicylique ; *Sigma, Prod.No. S-0875*
- Peroxyde d'hydrogène
- Acide polygalacturonique ; *Sigma, Prod.No. P-3889*
- Oligogalacturonides ; cfr II.3.i)
- Pectinases (Polygalacturonase ; Poly-{ 1,4- α -D-galacturonide } glycanohydrolase) ; *Sigma, P-4716*
- Phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) ; *Sigma, Prod.No. P8139*
- 1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) ; *Sigma, Prod.No. I6891*
- Diméthylaminopurine ; *Sigma, Prod.No. 2629*
- Calcimycine (calcium ionophore A23187 ; 1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl) ethyl ester ; *Molecular probe, Prod.No. A-7109*)

2. Méthodes relatives aux acides nucléiques

a) Extraction d'ARN totaux au TRIzol® (Boeringher)

Les cellules sont lysées dans une solution de TRIzol à base d'isothiocyanate de guanidine qui permet de maintenir intact l'ARN lors de la lyse. L'ARN est ensuite séparé des autres constituants en présence de chloroforme. Enfin, une précipitation en présence d'alcool isopropylique permet de récupérer l'ARN.

Solutions

- TRIzol® reagent (Total RNA Isolation Reagent, Boeringher)
- Alcool isopropylique (maintenu à -20°C)
- Chloroforme (maintenu à -20°C)
- Ethanol 75% eau DEPC
- Eau DEPC (0.1 %DEPC, incubé la nuit à 37°C puis autoclaver)
- Mortier et creusets autoclavés au four pasteur durant 1 nuit à 180°C
- Tips Rnase free

Méthode

1. Peser les plantes conservées à -80°C en veillant à ne pas les décongeler (200 mg de tissus sont nécessaires par extraction)
2. Broyer les plantules dans de l'azote liquide
3. Ajouter 3 ml de TRIzol par 200 mg de plantes
4. Homogénéiser rapidement et attendre la décongélation, puis incubé 3 minutes à température ambiante
5. Centrifuger à 12000 rpm (centrifugeuse Biofuge A) pendant 10 min à 4°C
6. Reprendre le surnageant dans un autre tube (le culot contient les membranes extracellulaires, les polysaccharides pariétaux et l'ADN de haut poids moléculaire)
7. Ajouter 0.2 ml de chloroforme par ml de TRIzol
8. Homogénéiser vigoureusement pendant 15 sec et laisser reposer 3 min à t° ambiante
9. Centrifuger à 12000 rpm (Centrifugeuse Biofuge A) pendant 15 min à 4°C
10. Prélever la phase supérieure qui contient l'ARN
11. Ajouter 0.5 ml d'alcool isopropylique par ml de TRIzol
12. Homogénéiser par inversion pendant 15 sec et laisser reposer 10 min à t° ambiante
13. Centrifuger à 12000 rpm (Centrifugeuse Biofuge A) pendant 10 min à 4°C
14. Eliminer le surnageant
15. Laver l'ARN avec de l'éthanol 75 % (Préparé avec de l'eau DEPC) à raison de 1 ml par ml de TRIzol en veillant à décrocher le culot
16. Centrifuger à 7500 rpm (centrifugeuse biofuge A) pendant 5 min à 4°C
17. Enlever le surnageant et sécher le culot à l'air libre pendant 10 minutes
18. Resuspendre le culot dans de l'eau DEPC (environ 20 μl)
19. Incuber les ARN à $55/60^{\circ}\text{C}$ pendant 10 minutes puis mettre sur glace. Les ARN sont ensuite incubés à -80°C

b) Dosage des acides nucléiques

i. Dosage des acides nucléiques au spectrophotomètre

Le dosage des acides nucléiques au spectrophotomètre est basé sur le principe que les acides nucléiques absorbent les ultra-violets à une longueur d'onde de 260 nm. Une unité de densité optique (DO) correspond à une concentration connue en ARN ou en ADN. Il est donc possible de calculer la concentration en acides nucléiques d'une solution grâce à sa DO.

Méthode

1. Régler le spectrophotomètre sur une longueur d'onde de 260 nm
2. Régler le zéro de l'appareil en utilisant comme blanc le tampon dans lequel se trouvent les acides nucléiques
3. Diluer 1 μl d'acide nucléique à doser dans 1 ml du tampon dans lequel se trouve l'acide nucléique et mélanger la cuvette par inversion
4. Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 260 nm au moyen d'une cuvette en quartz (1 DO d'ARN correspond à une concentration de $40\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1 DO d'ADN correspond à une concentration de $50\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
5. Mesurer ensuite l'absorbance à 280 nm pour doser les protéines et autres impuretés

ii. Dosage des acides nucléiques dans un gel d'agarose

Le dosage des acides nucléiques dans un gel d'agarose est une analyse comparative de la quantité d'ADN ou d'ARN présente dans le gel par rapport à un étalon de poids moléculaire. L'étalon de poids moléculaire utilisé au cours de ce mémoire est le smart ladder (Eurogentec). A chaque poids moléculaire présent dans le marqueur correspond une concentration en ADN (Fig.34) permettant de déterminer la quantité d'ADN présente dans un échantillon à doser.

c) Réaction de PCR (polymerase chain reaction)

Solutions

- x μl d'ADN
- 1 μl d'amorce gauche (10 pmol/ μl)
- 1 μl d'amorce droite (10 pmol/ μl)
- 5 μl de tampon PCR 10X
- 1 μl de dNTP (stock à 10 mM de chaque nucléotide, Boeringher)
- 1 Unité enzymatique (0.5 μl) de Taq polymérase (Roche)
- y μl d'eau stérile pour atteindre un volume final de 50 μl

Cycles d'amplification

Etape	Temps (min.)	Température (°C)	Répétition
Dénaturation	2 minutes	94°C	1X
Dénaturation	1 minute	94°C	29X
Hybridation	1 minute	Z°C	
Elongation	2 minutes	72°C	
Terminaison	5 minutes	72°C	1X

Z est la température d'hybridation (T_m) des amorces utilisées

Amorces (Eurogentec)

Plusieurs amorces ont été utilisées durant ce mémoire afin d'amplifier une partie de *WAK1* et de l'ubiquitine.

Les amorces pour *WAK1* (n°accession GenBank AJ009696) :

Wt-pESPt 5' CCC CCC GGG ATG AAG GTG CAG GAG GGT TTG 3' (T_m = 58°C)

WAK1dr 5' GAG ACA AGT GCT GTT CCC 3' (T_m = 58°C)

WAK1ga 5' AGG CCA CAT GTC TTA AGCGAC 3' (T_m=58°C)

Les amorces pour l'ubiquitine (gène UBP15, n°accession GenBank AF302665) :

UBP15dr 5' CGA GTT AAG TAT CCC TAA AGA GA 3' (T_m = 58°C)

UBP15ga 5' TCC TAT TCC AGC ACC GTA TCC 3' (T_m = 58°C)

d) Réaction de RT-PCR

i. Synthèse du premier brin de cDNA (Bulk first-strand cDNA synthesis kit (Amersham Pharmacia Biotech))

Le kit "first-strand cDNA synthesis kit" est utilisé pour la synthèse du premier brin d'ADNc. Ce kit comprend une reverse transcriptase d'origine virale (M-MuLV reverse transcriptase) qui a la capacité de former un brin d'ADN complémentaire à partir d'une matrice ARN grâce à son activité 5'-3' polymérase RNA dépendante. Ainsi, elle permet la formation d'un hétéroduplex ARN/ADN qui servira ensuite de matrice pour une PCR. L'ensemble de ces deux réactions se nomme RT-PCR.

Matériel

- Bains à 37°C et à 65°C
- ARN totaux
- Tips et eppendorf RNase free
- Glace
- Kit first-strand cDNA synthesis (Amersham)

Méthode

1. Mettre 4 µg d'ARN totaux dans un eppendorf RNase free
2. Ajuster le volume à 8 µl avec de l'eau DEPC
3. Chauffer 10 min à 65 °C
4. Mettre rapidement sur glace
5. Homogénéiser le mix (contenant la reverse transcriptase, la BSA et le nucléotides)
6. Ajouter 5 µl de mix à l'ARN
7. Ajouter 1 µl de DTT (stock 200 mM)
8. Ajouter 1 µl de primer Not I-d(T)18 (dilué 25 fois dans l'eau DEPC, stock 5 µg/µl)
9. Incuber pendant 1 h à 37°C

ii. Réaction de PCR sur ADNc

Le matériel et la méthode sont identiques à ceux explicités au point III.2.c., p35. Cinq µl d'ADNc sont utilisés au cours de la réaction. Afin de définir le nombre de cycles adéquats pour mettre en évidence les variations d'expression d'ARNm de *wak1*, des

prélèvements d'amplicons (5µl) sont effectués tous les 5 cycles à partir de 20 cycles d'amplification jusque 50 cycles.

e) Gel d'électrophorèse (gel horizontal)

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer des fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage en agarose du gel est ajusté en fonction de la taille des fragments à séparer. L'ADN est détecté dans le gel en présence de bromure d'éthidium qui s'intercale entre les deux brins d'ADN et visualisé grâce à un transilluminateur UV. La taille des fragments d'ADN est estimée en faisant co-migrer un étalon de fragments d'ADN de taille connue. L'étalon utilisé durant ce mémoire est le Smart ladder (Eurogentec, fig 34).

Solutions

- Tampon TAE (Tris-acétate 4 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0)
- Agarose 2 %
- Bromure d'éthidium (stock à 10 mg/ml)
- Solution de chargement 5X (Glucose 40 %, bleu de bromophénol 0.025 %)

Protocole

1. Préparer un gel d'agarose 2 % dans du TAE et ajouter 2 µl de bromure d'éthidium pour 50 ml de gel.
2. Couler le gel dans un support adéquat doté de peignes et laisser solidifier le gel pendant 30 minutes.
3. Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse (Pharmacia Biotech GNA100).
4. Ajouter 1 volume de solution de chargement à 5 volumes d'échantillons à analyser.
5. Déposer 10 µl par puits
6. Faire migrer les échantillons 1 heure à 80 mA dans le tampon TAE Visualiser les bandes au transilluminateur (302 nm)

f) Protocole de quantification des acides nucléiques dans un gel d'agarose (Fluor Smax imager Quantity one, Biorad)

Les gels d'agarose colorés au bromure d'éthidium ont été analysés au moyen de l'appareil fluor imager. Cette analyse permet la quantification des amplifications obtenues par RT-PCR au moyen du programme Quantity One. Celui-ci permet de calculer l'intensité d'une bande sur gel tout en éliminant le bruit de fond propre à chaque gel autorisant des comparaisons des intensités des bandes issues de gels différents.

Méthode

1. Placer les objectifs adéquats au niveau de la caméra (lentille de zoom : f-4 ; lentille 50mm : f-2.8 et filtre 520 LP)
2. Placer le gel sur le plateau, mettre au point et régler le grossissement
3. Acquérir l'image (le temps d'acquisition varie de 1 sec à 10s ec)
4. Ouvrir le programme Quantity One et suivre la procédure d'analyse décrite dans le manuel (Quantity One, user guide for version 4 Windows and Macintosh)
5. Les données sont sauvegardées sous format Excel pour analyse et traitement ultérieurs

g) Purification et séquençage d'un produit PCR

i. Purification

La purification d'un produit issu d'une PCR se réalise grâce au système microcon YM100 (amicon) qui permet l'élimination des sels du tampon PCR, des dNTP et de la Taq polymérase grâce à une colonne de cellulose qui retient l'ADN.

Méthode

1. Prendre 45 µl de produit PCR
2. Ajouter 400 µl d'eau
3. Centrifuger à 7000 rpm (centrifugeuse biofuge A) pendant 15 minutes (colonne microcon vers le haut)
4. Retourner la colonne microcon et ajouter 20 µl d'eau.
5. Centrifuger à 4000 rpm (centrifugeuse biofuge A) pendant 15 minutes
6. Stocker l'ADN ainsi purifié à -20°C jusqu'à utilisation

ii. Réaction de séquençage (Abi Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready reaction kit- PE applied biosystems)

Matériel

L'ADN utilisé pour le séquençage a subi une PCR de préséquénage avec les amorces internes au vecteur (dans notre cas, pCRII), une purification sur microcon et un dosage sur gel d'agarose. Les quantités d'ADN nécessaires sont fonction de la taille du fragment :

Entre 1000 et 2000 pb.....10 à 40 ng d'ADN purifié

Entre 500 et 1000 pb.....5 à 20 ng d'ADN purifié

Entre 200 et 500 pb.....3 à 10 ng d'ADN purifié

Méthode

1. Placer, dans un tube eppendorf de 1.5ml, l'ADN et le primer (10 pmol/µl, WAK1ga ou WAK1dr) à la concentration adéquate et ajuster pour un volume final de 12 µl
2. Les échantillons sont séquencés au moyen l'appareil ABI PRISM 377 DNA Sequencer de Perkin-Elmer (laboratoire de neurobiologie)

h) Clonage dans pCRII (TA cloning kit pCRII vector, invitrogen)

La Taq polymerase utilisée génère de fragments avec des extrémités protrudantes terminées par une adenine. Le clonage dans pCRII (Fig.35) exploite cette caractéristique puisque le plasmide linéarisé possède des extrémités protrudantes terminées par une thymine.

La présence d'un gène de résistance à l'ampicilline et le gène LacZ permettent de sélectionner les bactéries recombinantes sur un milieu LB contenant de l'ampicilline et la sélection blanc/bleu se réalise en présence de X-Gal et d'IPTG.

Protocole

1. Déterminer la quantité de produit PCR nécessaire pour une ligation en présence de 50 ng de vecteur pCRII (~ 3900pb, carte ci-contre) au moyen de la formule suivante :

$$X \text{ ng produit PCR} = \frac{(Y \text{ pb produit PCR})(50 \text{ ng vecteur})}{(Z \text{ pb vecteur})}$$

2. Préparer le mix de ligation : X µl de produit PCR
 - 1 µl de tampon de ligation 10X
 - 2 µl de vecteur pCRII (25ng/µl)
 - 4 unités de T4 DNA ligase (1 µl)
 - Ajouter de l'eau pour un volume de 10µl
3. Incuber une nuit à 16°C

i) Transformation de bactéries (One shot transformation kit, invitrogen)

La transformation de bactéries se base sur un choc thermique qui a pour effet de perturber l'intégrité membranaire et de faciliter l'entrée d'une molécule d'ADN exogène dans la cellule. Les souches de *E. coli* Top10F' compétentes utilisées pour la transformation ont les caractéristiques génétiques suivantes : F'⁺{*lacI*^q, Tn10(Tet^r)} *mcrA* Δ (*mrr-hsd RMS-mcrBC*) Φ80 *lacZ* M15 Δ*lacX74 deoR recA1 araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL*(Str^r) *endA1 nupG*

Protocole

1. Prendre le nombre adéquat de tubes de cellules compétentes et les mettre sur glace
2. Ajouter 2 µl de produit de ligation dans les tubes de cellules compétentes et mélanger doucement
3. Incuber sur glace pendant 30 min
4. Placer les tubes dans un bain à 42°C pendant 30 sec
5. Placer immédiatement les tubes sur glace pendant 2 min
6. Ajouter 250 µl de SOC (Bactotryptone 2%, extrait de levure 0.5%, NaCl 10mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM et glucose 20 mM) dans chaque tube
7. Placer les tubes sous faible agitation à 37°C pendant 1 heure
8. Etaler 50 à 200 µl de bactéries transformées sur un milieu LB contenant 135 µl d'ampiciline (10 mg/ml), 35 µl d'IPTG (20 mg/ml) et 35 µl de X-GAL (20 mg/ml) pour la sélection des clones transformés
9. Incuber à 37°C pendant au moins 18 heures et placer les boîtes à 4°C pour optimiser l'apparition de la coloration

j) Miniprep d'ADN plasmidique d' *E.coli*

Solutions

- Tampon Tris 25 mM (pH 8.0), glucose 50 mM, EDTA 10 mM + lysosyme 4 mg/ml (à ajouter au dernier moment)
- NaOH 0.2 M, SDS 1 %
- Acétate de potassium 3 M, Acide acétique 10 %
- Phénol/Chloroforme/Alcool isoamylique (25 :24 :1)
- Ethanol 96% (maintenu à -20°C)
- Ethanol 76% (maintenu à -20°C)

- Tris 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM
- RNase 10 mg/ml (Amersham, Cat.No. E780-20y)

Protocole

1. Préparer une préculture de 3 ml de LB avec l'antibiotique adéquat et incuber la nuit à 37°C sous agitation
2. Centrifuger 1.5 ml de suspension bactérienne dans un eppendorf de 1.5 ml à 13000 rpm (centrifugeuse biofuge A) pendant 2 min et accumuler les 2 culots dans un même eppendorf en éliminant le surnageant entre les étapes
3. Ajouter au culot 150 µl d'une solution de glucose 50 mM, Tris 25 mM ; EDTA 10 mM (pH 8.0) et lysozyme 4 mg/ml (à ajouter juste avant l'utilisation)
4. Incuber 5 min sur glace
5. Dénaturer l'ensemble de l'échantillon avec 300 µl de NaOH 0.2 M ; SDS 0.1 % et incuber 5 min sur glace
6. Ajouter 150 µl d'acétate de potassium 3M, acide acétique glacial 10 % et mélanger par inversion puis incuber 5 min sur glace
7. Centrifuger à 13000 rpm (centrifugeuse biofuge A) pendant 15 min à 4°C
8. Transférer le surnageant dans un nouvel eppendorf, y ajouter 400 µl d'une solution Phénol/Chloroforme/Alcool isoamylique (25 :24 :1), et mélanger par inversion
9. Centrifuger à 13000 rpm pendant 2 min à 4 °C
10. Transférer la phase aqueuse (phase supérieure) dans un nouvel eppendorf, y ajouter 1000 µl d'éthanol 100% à - 20°C et incuber à -70°C pendant 15min
11. Centrifuger à 13000 rpm (centrifugeuse biofuge A) pendant 10min à 4°C
12. Laver le culot avec de l'éthanol 76% et centrifuger à 13000 rpm (centrifugeuse biofuge A) pendant 5 min et à 4°C (Vortexer pour décrocher le culot)
13. Répéter une fois la dernière opération
14. Sécher le culot à l'air libre pendant une vingtaine de minutes et resuspendre dans 20 µl d'eau stérile
15. Ajouter 2 µl de solution de RNase (10 mg/ml) et incuber pendant 1 heure à 37°C

2. Méthodes relatives aux protéines

a) Extraction de protéines végétales

L'extraction des protéines végétales a été réalisée au départ de plantes ayant une semaine de culture sur un milieu solide et qui ont subi des traitements en milieu liquide. Le protocole d'extraction est celui utilisé pour extraire la protéine *WAK1* (Kohorn *et al.*, 1996).

Solutions

- Tampon d'extraction : 50 mM Tris (pH 6.8), 50 mM DTT, 4 % SDS, 0.05 % Bleu de bromophénol, 10 % Glycérol.
- Azote liquide

Protocole

1. Broyer 300 mg de tissu dans l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une fine poudre.
2. Attendre que tout l'azote se soit évaporé et ajouter 1.5 ml de tampon d'extraction
3. Centrifuger 5 minutes à 4000 rpm (centrifugeuse biofuge A) et à 4°C
4. Stocker à -80°C jusqu'à utilisation

b) Electrophorèse SDS-PAGE (Méthode de Laemmli)

Solutions

- 1X SDS gel loading buffer : Tris-HCl 50 mM ; pH 6.8 ; DTT 100mM ; SDS 2 % ; Bleu de bromophénol 0.1 % ; Glycérol 10 %
- Tampon d'électrophorèse : Tris 25 mM ; Glycine 250 mM, pH 8.3, SDS 0,1 %
- SDS 10 %
- APS 10 %
- Tris 1.5 M (pH 8.8)
- Tris 1 M (pH 6.8)
- TEMED

Préparation des gels

a) Running gel 12% (Pour un gel de 10 ml)

- | | |
|--------------------------------|----------|
| 1. Eau | 3.3 ml |
| 2. 30% acrylamide mix (biorad) | 4.0 ml |
| 3. 1,5M Tris pH 8,8 | 2.5 ml |
| 4. 10% SDS | 0.1 ml |
| 5. 10% APS | 0.1 ml |
| 6. TEMED | 0.004 ml |

b) Stacking gel 5% (pour un gel de 4 ml)

- | | |
|--------------------------------|----------|
| 1. Eau | 2.7 ml |
| 2. 30% acrylamide mix (biorad) | 0.67 ml |
| 3. 1M Tris pH 6,8 | 0.5 ml |
| 4. 10% SDS | 0.04 ml |
| 5. 10% APS | 0.04 ml |
| 6. TEMED | 0.004 ml |

Méthode (Cuve Biorad miniprotean II)

1. Monter les plaques d'électrophorèse selon les indications du fabricant (spacers de 0.75 mm d'épaisseur)
2. Couler le running gel et couvrir d'éthanol 100 %. Attendre 20 min pour la polymérisation
3. Couler le stacking gel et monter le peigne adéquat
4. Monter les plaques sur le support d'électrophorèse et déposer celui-ci dans la cuve en suivant les indications du fournisseur
5. Remplir les compartiments de tampon d'électrophorèse
6. Charger le gel avec 15 µl d'échantillon et 10 µl d'étalon de poids moléculaire (Bio-Rad, Prestained broad range, Cat.No. 161-0372)
7. Régler l'appareil sur 150 V et attendre que le front de migration soit arrivé au bas du gel
8. Le gel peut ensuite être coloré au bleu de Coomassie ou être peut être utilisés en western-blot

c) Coloration des protéines au bleu de coomassie

Solutions

- Solution de coloration : bleu de coomassie (Brillant blue R250) 0.1 %, Méthanol 40 %, acide acétique 10 % et eau 50 %.
- Solution de décoloration : méthanol 40 %, acide acétique 10 % et eau 50 %.

Protocole

1. Plonger le gel dans la solution de coloration pendant 30 minutes.
2. Retirer le gel de la solution de coloration et le plonger dans la solution de décoloration pendant 30 minutes en renouvelant plusieurs fois la solution jusqu'à décoloration adéquate

d) Extraction de protéine totales de *E.coli*

L'extraction de protéines de *E. coli* a été pratiquée dans le but de réaliser l'épuisement du sérum de lapin. Celui-ci contient en effet une série de d'anticorps dirigés contre les protéines de cette bactérie dont il est nécessaire de se débarrasser si on veut utiliser le polysérum dans des expériences de western-blot par exemple. Les souches de *E. coli* utilisées contiennent un plasmide portant le gène crebB.

Protocole

1. Préparer une culture de *E.coli* dans 3 ml de LB avec 18 µl d'ampiciline (Stock 10 mg/ml) et laisser une nuit à 37°C sous agitation
2. Prélever 500µl de suspension bactérienne
3. Centrifuger à 13.000 rpm (centrifugeuse biofuge A) pendant 5 minutes
4. Eliminer le surnageant
5. Resuspendre dans 50 µl de SDS gel sampler 1X (Tris-HCl 50 mM ; pH 6.8 ; DTT 100mM ; SDS 2 % ; Bleu de bromophénol 0.1 % ; Glycérol 10 %)
6. Soniquer 5 fois pendant 10 secondes
7. Chauffer à 100°C pendant 5 minutes

e) Dot-blot

Le dot-blot est une technique consistant à déposer un antigène sur une membrane afin de détecter celui-ci au moyen d'anticorps spécifiques. Dans notre cas, le dot-blot a été utilisé pour déterminer, rapidement, les quantités optimales de protéines à déposer en western-blot ainsi que les dilutions adéquates d'anticorps primaire à utiliser.

Solutions

- TBS (Tris buffer saline) : 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.5
- TBST : TBS + Tween-20 0.1 %
- TBST + BSA (albumine bovine) 3 %
- Solution de révélation : 10 ml de Tris 0.1 M, $MgCl_2$ 0.05 M, pH 9.5 + 37.5 μ l de X phosphate/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Boeringher) + 50 μ l de nitro blue tetrazolium (Boeringher)
- Anticorps primaire (sérum d'un lapin immunisé contre le domaine extra-cellulaire de la protéine *WAK1*)
- Anticorps secondaire (Anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated, Sigma)

Protocole

1. Découper un morceau de membrane de nitrocellulose (Hybond™-C extra, Amersham) de taille voulue
2. Incuber la membrane dans l'eau désionisée pendant 5 minutes puis laisser sécher à l'air libre.
3. Déposer 1 μ l de protéines à tester sur la membrane et laisser sécher 15 minutes.
4. Répéter une fois l'opération précédente
5. Incuber la membrane dans du TBST+ BSA 3 % pendant 1 heure à température ambiante.
6. Epuiser l'anticorps primaires (dilution 500) pendant 1 heure en présence d'une fraction protéique brute d'*Escherishia coli* (dilution 50) dans du TBST 0.1 %. L'épuisement a pour but d'éliminer les anticorps dirigés contre les protéines de cette bactérie que le lapin immunisé a naturellement produit
7. Incuber la membrane avec une dilution du sérum dans du TBST pendant 1 heure à température ambiante
8. Laver 3 fois la membrane dans du TBST pendant 5 minutes
9. Incuber avec l'anticorps secondaire (Anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated, Sigma) dilué 30.000 fois dans du TBST pendant 1 heure à température ambiante.
10. Laver 3 fois la membrane dans du TBST pendant 5 minutes.
11. Révéler avec la solution de révélation à l'obscurité pendant au moins 5 minutes.
12. Arrêter la révélation en plongeant la membrane dans de l'eau désionisée

f) Western-blot

Le western-blot est une technique de détection des protéines similaire au dot-blot mais ayant subi une migration préalable dans un gel d'acrylamide et un transfert sur une membrane de nitrocellulose.

Solutions

- TBS (Tris buffer saline) : 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.5
- TBST : TBS + Tween-20 0.1 %

- TBST + BSA (albumine bovine) 3 %
- Solution de révélation : 10 ml de Tris 0.1 M, $MgCl_2$ 0.05 M, pH 9.5 + 37.5 μ l de X phosphate/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Boeringher) + 50 μ l de nitro blue tetrazolium (Boeringher)
- Tampon de transfert (192 mM glycine, 25 mM TRIS et méthanol 20%)
- Anticorps primaire (sérum d'un lapin immunisé contre le domaine extra-cellulaire de la protéine WAKI)
- Anticorps secondaire (Anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated, Sigma)

Protocole

1. Faire migrer les protéines dans un gel d'acrylamide
2. Séparer le gel d'empilement du gel de migration. Equilibrer le gel dans le tampon de transfert pendant 10 minutes.
3. Couper les papiers buvards ainsi que la membrane de nitrocellulose (Hybond™-C extra, Amersham) à la dimension du gel de migration.
4. Humidifier la membrane avec de l'eau distillée puis tremper celle-ci dans le tampon de transfert pendant 5 minutes.
5. Assembler la cassette de transfert en évitant la formation de bulles d'air.
6. Remplir la cuve (Hoefer TE) avec du tampon de transfert jusqu'au niveau des électrodes.
7. Placer un barreau magnétique dans le fond de la cuve et connecter celle-ci à un bain thermostaté à une température de 4°C.
8. Connecter la source de courant à la cuve de transfert. Les conditions de transfert sont 1.0 A et 100 V pendant 2 heures.
9. Après 2 heures de transfert, déconnecter la source de courant et retirer la cassette.
10. Retirer la membrane et incuber celle-ci dans du TBST+ BSA 3 % pendant 1 heure à température ambiante.
11. Epuiser l'anticorps primaire (dilution 500) pendant 1 heure en présence d'une fraction protéique brute d'*Escherichia coli* (dilution 50) dans du TBST 0.1 %. L'épuisement a pour but d'éliminer les anticorps dirigés contre les protéines de cette bactérie que le lapin immunisé a naturellement produit
12. Incuber la membrane avec une dilution du sérum dans du TBST pendant 1 heure à température ambiante
13. Laver 3 fois la membrane dans du TBST pendant 5 minutes
14. Incuber avec l'anticorps secondaire (Anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated, Sigma) dilué 30.000 fois dans du TBST pendant 1 heure à température ambiante.
15. Laver 3 fois la membrane dans du TBST pendant 5 minutes.
16. Révéler avec la solution de révélation à l'obscurité pendant au moins 5 minutes.
17. Arrêter la révélation en plongeant la membrane dans de l'eau désionnée

g) Dosage colorimétrique des protéines par la méthode Bradford

Le réactif de dosage, constitué d'acide phosphorique et de méthanol, réagit avec les acides aminés basiques et aromatiques pour former un composé de couleur bleue dont l'absorbance est mesurée à 595nm. La concentration en protéine d'un échantillon est déterminée grâce à une droite étalon préalablement réalisée avec des solutions de concentrations connues BSA.

Protocole

1. Réaliser la droite de calibration à partir de solutions de concentrations différentes en BSA (de 0.2mg/ml à 1.4 mg/ml) : Prendre 99 μ l du stock de BSA, 1 μ l de bleu de bromophénol et 5 ml de réactif de dosage (dilué 5 fois dans de l'eau désionnisée) et mesurer la DO à 595 nm.
2. Préparer le réactif de dosage (Biorad, protein assay, Cat.No. 500-0002) en le diluant dans de l'eau désionnisée (1 ml de réactif pour 4 ml d'eau)
3. Ajouter 1 μ l de la solution de protéine à doser et 99 μ l de TBS au réactif de dosage dilué et attendre 5 minutes
4. Mesurer l'absorbance à 595 nm et calculer la concentration grâce à la droite de calibration

Pour les échantillons protéiques qui contiennent plus de 0.1 % de SDS, une dialyse des protéines est nécessaire afin de se débarrasser de celui-ci et des autres sels par la même occasion. La dialyse des protéines peut se faire sur une colonne microcon (micrcon YM30, Amicon) selon le principe suivant :

Protocole

1. Déposer 500 μ l de produit d'extraction de protéines végétales sur la colonne microcon
2. Centrifuger à 13000 rpm (centrifugeuse Biofuge A) pendant 30 min à 4°C pour éliminer le tampon d'extraction
3. Inverser la colonne microcon et déposer 20 μ l de TBS
4. Centrifuger à 3000 rpm (centrifugeuse Biofuge A) pendant 3 min à 4°C et stocker à -80°C jusqu'à utilisation

4. Protocole de purification des oligopectates de $DP \geq 9$

Les oligopectates de degré de polymérisation supérieur ou égal à 9 ($DP \geq 9$) sont les seuls capables de former une structure en « egg-box » en emprisonnant des ions Ca^{++} . Cette propriété est utilisée pour les purifier en présence de baryum. L'avantage du baryum est qu'il peut être « déplacé » par la suite par du $NaSO_4$ et que le sulfate de baryum est éliminé par précipitation.

Solutions

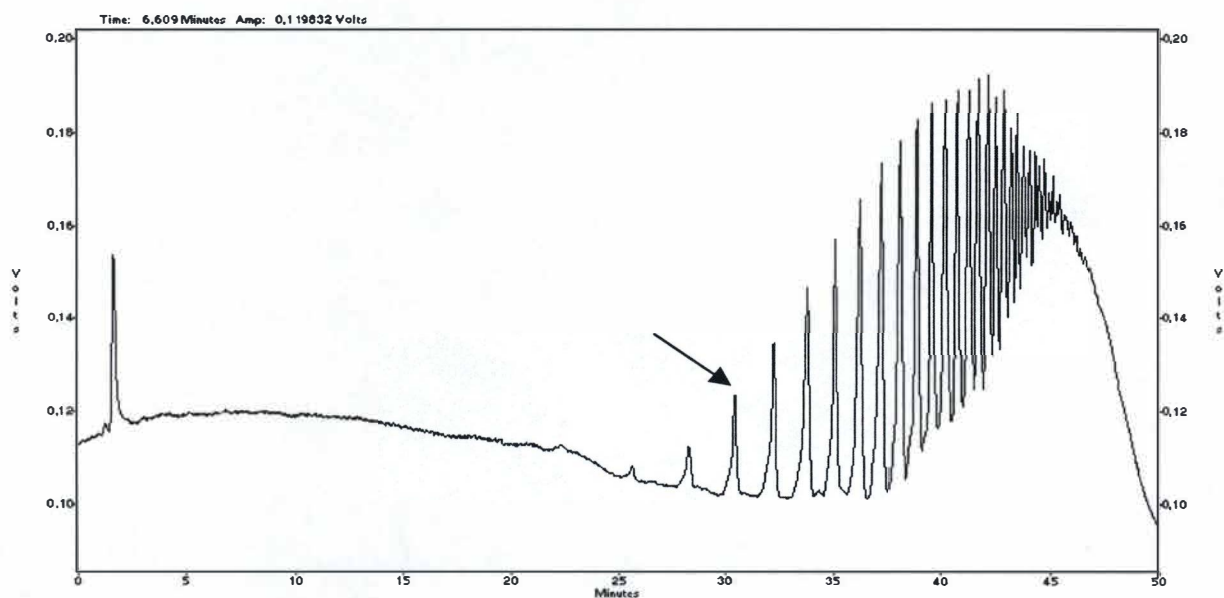
- Pectates de Na^+ (*Sigma ; Prod.No. P-3889*), $NaCl$, $BaCl_2$, Na_2SO_4
- Alcool dénaturé
- HCl 37%

Protocole

1. Réaliser une hydrolyse à reflux de 500 ml d'une solution de pectates de Na^+ 10 g/l pendant 4 heures à $100^\circ C$. Après refroidissement, porter le pH de la solution à 5.2
2. Précipiter les oligopectates de $DP \geq 9$ en ajoutant du $NaCl$ jusqu'à une concentration finale de 0.8 M puis centrifuger à 5000 rpm pendant 15 minutes (centrifugeuse beckman J2-21)
3. Eliminer le surnageant et suspendre le culot dans 400 ml d'eau désionisée.
4. Précipiter les oligopectates de $DP \geq 9$ avec 0.1 g de $BaCl_2$ par g de pectate de sodium.
5. Centrifuger à 5000 rpm (centrifugeuse beckman J2-21) pendant 15 minutes.
6. Eliminer le surnageant et suspendre le culot dans 200 ml d'eau désionisée.
7. Précipiter le baryum en ajoutant 1.2 g de Na_2SO_4 .
8. Centrifuger à 5000 rpm (centrifugeuse beckman J2-21) pendant 15 minutes et concentrer le surnageant au rotavapor.
9. Centrifuger à 5000 rpm (centrifugeuse beckman J2-21) pendant 15 minutes et récupérer le surnageant.
10. Porter la solution à 60 ml avec de l'eau désionisée, ajouter 240 ml d'alcool dénaturé et 12 ml d' HCl 37 % ; centrifuger à 5000 rpm (centrifugeuse beckman J2-21) pendant 15 minutes.
11. Répéter les 2 opérations précédentes et resuspendre le culot dans 200 ml d'eau désionisée.
12. Ajuster la concentration finale en $NaCl$ à 0.8M afin de précipiter les oligopectates de $DP \geq 9$; ajuster le pH à 7 et centrifuger à 5000 rpm (centrifugeuse beckman J2-21) pendant 15 minutes.
13. Suspendre le culot dans 40 ml d'eau désionisée et 160 ml d'éthanol.
14. Centrifuger à 5000 rpm (centrifugeuse beckman J2-21) pendant 15 minutes.
15. Eliminer le surnageant et évaporer l'éthanol du culot en séchant 2 jours à l'air libre.
16. Broyer le culot sec et stocker à $-20^\circ C$.

Afin de vérifier leur DP, les oligopectates ont été analysés par HPLC sur une colonne CarboPac PA 100. Cette colonne contient une résine de polystyrène-divinylbenzène contenant des groupements sulfites (SO_3^-) sur lesquels sont greffés des groupements amines (NR_3^+). A pH 7, les oligos pectates chargés négativement se fixent sur la résine. Ils sont ensuite élués au moyen d'un gradient de $NaOAc$ (de 5 mM à 1 M). Les oligopectates de DP faible, les moins chargés, sont élués les premiers. En sortie de la colonne, les groupements hydroxyles de l'acide galacturonique sont ionisés dans une solution de $NaOH$ (0.5 M). La détection de ces molécules chargées est réalisée au moyen d'un détecteur à ampérométrie pulsée (Dionex).

La figure ci-dessous présente un schéma de sortie HPLC avec des oligos de $DP \geq 9$. Les oligos de $DP=9$ sortent en premier après 30 minutes (le pic est indiqué par une flèche).



IV

Résultats et discussion

IV

Résultats et discussion

IV Résultats et discussion

1. Rappel des objectifs du mémoire

Les voies de transduction du signal impliquant les protéines WAK en général, et WAK1 en particulier, sont peu connues. L'objectif de ce mémoire vise à identifier des mécanismes aboutissant à l'activation transcriptionnelle du gène *wak1* grâce aux modulateurs connus pour intervenir dans d'autres voies de transduction du signal chez les végétaux.

Dans un premier temps, nous identifierons des modulateurs pouvant faire varier les niveaux de transcrits du gène *wak1* chez *Arabidopsis thaliana*. Dans un deuxième temps, une analyse quantitative de la protéine WAK1 nous permettra de mettre en évidence des variations du taux de la protéine WAK1 en réponse à ces mêmes modulateurs.

Pour ce faire, des analyses par RT-PCR « semi-quantitative » seront utilisées afin de mesurer les variations du taux de transcription du gène *wak1*, tandis que des analyses en western-blot et en dot-blot seront pratiquées pour détecter une éventuelle modification du taux de protéines dans la plante suite à différents traitements.

2. Mise au point des conditions expérimentales

Des plantules d'*Arabidopsis thaliana* ont été utilisées pour mener cette étude. *Arabidopsis thaliana* est une plante de la famille des crucifères. Son petit génome (5 chromosomes par génome haploïde, 130Mb et environ 25000 gènes), sa culture aisée et son cycle de reproduction très rapide (environ 2 mois) ont fait de cette plante un organisme modèle en biologie végétale.

Avant de passer à l'étude de WAK1, nous avons dû définir un protocole expérimental permettant de disposer de suffisamment de matériel végétal pour mener à bien les extractions d'ARN et de protéines, ainsi que d'un moyen aisé pour appliquer les différents traitements. Pour cela, les graines d'*Arabidopsis thaliana* sont préalablement mises à germer pendant une semaine en milieu MS (Murashige et Skoog) liquide, permettant l'obtention d'un taux de germination de quasiment 100%. Ces plantules ont ensuite été repiquées sur un milieu MS solide pour une durée d'une semaine, durant laquelle se réalise la croissance et l'élongation des plantules. Les plantules âgées de deux semaines ont ensuite été placées dans un milieu liquide où elles subiront les différents traitements (**Fig.36**).

3. Analyse des variations des taux de transcrits *wak1*

La mise en évidence de la transcription d'un gène peut-être étudiée à l'aide de deux techniques couramment utilisées que sont le Northern-blot et la RT-PCR.

La première de ces techniques présente l'avantage de permettre une quantification aisée du taux de transcription d'un gène et de rendre compte, avec fiabilité, des variations de ce taux. Malgré cela, le faible seuil de sensibilité de cette technique et sa lourdeur, en font une méthode de plus en plus délaissée au profit d'une technique beaucoup plus sensible et rapide : la RT-PCR. Celle-ci nécessite par contre une mise au point plus fastidieuse afin de pouvoir quantifier convenablement les transcrits. La RT-PCR est la technique qui a été utilisée durant ce mémoire.

a) **Mise au point de la technique de RT-PCR « semi-quantitative » sur notre matériel**

i. **Généralités sur la RT-PCR « semi-quantitative »**

Le principe de la RT-PCR «semi-quantitative » consiste à mettre en évidence des différences quantitatives dans plusieurs populations d'ADNc obtenues au départ d'une même quantité d'ARN grâce à une reverse transcriptase. La population d'ADNc est représentative de l'état transcriptionnel de la plante au moment de l'extraction d'ARN. Les différences observées au niveau de l'amplification PCR reflètent des différences dans les taux de transcrits des gènes étudiés.

Différentes techniques de RT-PCR sont utilisées. On les classe en deux catégories que sont les RT-PCR dites qualitatives, telles que la « RT-PCR classique », et les RT-PCR dites quantitatives, telles que la « RT-PCR quantitative » (*Freeman et al., 1999*) et la « RT-PCR semi-quantitative » (*Helleboid et al., 2000 ; Leblanc et al., 1999*).

L'utilisation d'un standard lors de la RT-PCR permet de confirmer les variations des niveaux de transcrits observés pour le gène d'intérêt. Dans le cas de la RT-PCR « semi-quantitative », le standard est dit externe. Il consiste en la réalisation d'une RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques d'un gène exprimé de manière constitutive dans la plante (ubiquitine, actine,...) sur le même échantillon d'ADNc que celui utilisé pour étudier la transcription du gène d'intérêt. Ainsi, sur différentes populations d'ARN total, au départ d'une même quantité d'ARN total et dans les mêmes conditions de synthèse d'ADNc et d'amplification PCR, ce standard doit être amplifié de façon identique dans les différents échantillons. La RT-PCR quantitative est, quant à elle, basée sur une co-amplification compétitive d'une séquence

d'intérêt avec un standard dit interne de concentration connue, dans un même tube PCR et avec les mêmes amorces. L'amplification du standard et du fragment d'intérêt doivent se dérouler avec la même efficacité. La quantification est réalisée en comparant l'intensité de l'amplification du fragment d'intérêt (de concentration inconnue) avec l'intensité de l'amplification du standard interne, sur base de sa concentration de départ initiale.

La nécessité d'une mise en évidence des variations des taux de transcrits et d'une mise au point rapide de la technique nous a conduit à choisir la technique de RT-PCR semi-quantitative pour évaluer les variations des quantités de transcrits de notre gène d'intérêt : *wak1*

ii. Définition d'amorces spécifiques de *wak1* utilisables en RT-PCR

Une première paire d'amorces disponible au laboratoire (WAK1ga et WAK1dr) amplifiant un fragment spécifique de *wak1* a été utilisée. La position des amorces sur la séquence *wak1* est présentée à la figure 37.

Les amorces ont été testées sur de l'ADN génomique (**Fig.38A**) et sur de l'ADNc d'*Arabidopsis thaliana* (**Fig.38B**) aux températures d'hybridation suivantes : 56, 58 et 60°C. Des prélèvements d'amplicons (5 µl) ont été réalisés après 20 cycles d'amplification puis tous les 5 cycles jusque 50 cycles. La température d'hybridation offrant la meilleure l'amplification s'avère être 58°C (résultats non montrés pour 56 et 60°C). En effet, à 25 cycles, la bande attendue de 564 pb est présente, par contre, les prélèvements réalisés au delà de 25 cycles montrent l'apparition d'un « smear » dans les poids moléculaires supérieurs à celui de la bande d'intérêt. Nous constatons également une disparition de la bande d'intérêt, ce qui est également observé pour les autres température d'hybridation. Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à la présence de ce smear. Nous suspectons tout d'abord un manque de spécificité des amorces révélé progressivement au cours de l'augmentation du nombre de cycles. La disparition progressive de l'amplification du fragment d'intérêt parallèlement à l'apparition du smear nous fait également supposer que les fragments amplifiés pourraient former entre eux des structures plus grandes qui seraient amplifiées. Cette première paire d'amorces est donc inutilisable en RT-PCR.

Une autre paire d'amorces a donc été testée (WAK1 dr, déjà présente dans la première paire et Wt-pESPt). La position des amorces sur la séquence de *wak1* est présentée à la figure 38. Celles-ci amplifient un fragment de 774 pb. Tout comme pour la première paire d'amorces, plusieurs températures d'hybridation (56, 58 et 60°C) ont été testées sur ADNg et

ADNc, et 58°C s'est également avéré être la température d'hybridation la plus efficace et le smear observé avec les premières amorces n'apparaît plus (**Fig.39**).

iii. Vérification de la spécificité de l'amplification

L'existence de cinq gènes *wak* différents mais présentant des domaines conservés (les isoformes partagent 40 à 64 % d'identité pour le domaine extracellulaire tandis que les domaines kinases sont très conservés) impose de s'assurer que les amorces utilisées soient spécifiques de *wak1*. Pour ce faire, le produit d'une PCR réalisée sur l'ADNc de plantes n'ayant subi aucun traitement a été inséré dans le plasmide pCRII. Le produit de ligation a été utilisé pour transformer des bactéries Top10F'. Une PCR a été réalisée sur un clone positif et le produit de la réaction a été séquencé. L'alignement de la séquence du produit PCR avec la séquence *wak1* publiée (n°accession GenBank AJ009696) montre que nos amorces amplifient la bonne isoforme. L'utilisation de cette séquence PCR dans une recherche Blast permet de retrouver *wak1* uniquement.

iv. Effet de la variation du nombre de cycles d'amplification

Lors d'une réaction de PCR, deux phénomènes se succèdent. Le premier consiste en l'amplification exponentielle du fragment spécifique et le second correspond à l'arrêt de cette amplification appelé phase plateau (**Fig.40**). Cette phase plateau est expliquée par la compétition entre les amplicons et les primers ou par la diminution de la stabilité de la Taq polymérase (*Innis et al., 1990*). La quantification par RT-PCR nécessite de détecter les amplicons avant la phase plateau sous risque de ne plus pouvoir mettre en évidence des variations de la quantité de transcrits.

Dans cette optique, des prélèvements ont été réalisés à 20, 25 et 30 cycles d'amplification PCR pour chacune des expériences afin d'identifier la phase d'amplification exponentielle. La figure 40 (puits 1, 2 et 3) montre que l'amplification de *wak1* atteint la phase plateau après 30 cycles d'amplification. Dans les expériences ultérieures, nous ne prélèverons donc pas d'amplicons après 30 cycles.

v. *Le standard externe*

Nous avons utilisé le gène de l'ubiquitine (*Ubp15*, n°accession GenBank AF302665) comme standard externe pour vérifier l'homogénéité des différentes étapes de la RT-PCR. De nombreuses isoformes d'ubiquitine étant présentes chez les végétaux et, sur base d'alignements de ces isoformes, des amorces PCR ont été définies dans des zones spécifiques du gène *Ubp15* d'*Arabidopsis thaliana* cfr III.2.c., p37). Deux températures d'hybridation (58 et 60°C) ont été testées sur de l'ADN génomique (**Fig.41**). L'amplification est meilleure à 58°C et donne un fragment de taille attendue (200 pb). Cette température d'hybridation étant la même que celle des amorces utilisées pour l'amplification de *wak1*, les deux amplifications pourront se faire simultanément dans le même appareil.

Afin de déterminer la phase plateau de l'amplification de l'ubiquitine, des prélèvements d'amplicons ont été réalisés à 20, 25, 30, 35, 40, 45 et 50 cycles lors d'une amplification sur de l'ADNc. Comme pour *wak1*, la phase plateau est atteinte dès 30 cycles (données non montrées).

Les conditions nécessaires à l'amplification par RT-PCR du fragment d'ADN spécifique de *wak1* et du standard externe étant mises au point, la validité de notre protocole expérimental a été testée en traitant les plantes avec de l'acide salicylique. Ce dernier a été décrit dans la littérature comme étant un activateur transcriptionnel du gène *wak1* (Kohorn et al., 1998). L'augmentation du taux de transcription de *wak1* en présence d'acide salicylique sera ainsi utilisée comme témoin de la fiabilité de notre protocole expérimental.

vi. *Analyse des taux de transcrits de wak1 après un traitement à l'acide salicylique*

Pour rappel, l'acide salicylique est décrit comme étant un activateur transcriptionnel de *wak1* (Kohorn et al., 1998). C'est également un messenger secondaire très important dans la réponse de défense de la plante (cfr I.4.e) et une concentration élevée en acide salicylique, représentant un stress important pour les plantes, conduit à la mort des cellules végétales.

Afin de valider notre protocole expérimental, des plantes de deux semaines ont été incubées pendant 24 et 48 heures en présence de différentes concentrations en acide salicylique (1 mM, 0.5 mM, 0.2 mM et 0.05 mM). Les plantes soumises à une concentration de 1 mM sont mortes durant le traitement, probablement parce que cette concentration élevée en acide salicylique représente pour la plante un stress important déclenchant un programme de mort cellulaire. Dans la littérature, seules les concentrations de 1 mM et 0.5 mM ont été

utilisées (Kohorn *et al.*, 1998), mais l'acide salicylique était vaporisé sur des plantes cultivées en milieu solide.

L'ARN total des plantes restantes a été extrait au moyen de la méthode au TRIzol. Après vérification de l'intégrité de l'ARN extrait sur gel d'agarose (**Fig.42**) et dosage au spectrophotomètre, nous avons prélevé 4 µg d'ARN nécessaire pour les réactions de RT-PCR. Seuls les échantillons ayant un rapport de DO 260/280 compris entre 1.5 et 2.0 ont été utilisés.

La réaction de RT-PCR proprement dite a été réalisée sur l'ADNc obtenu et des prélèvements d'amplicons (5 µl) ont été réalisés après 20, 25 et 30 cycles d'amplification. Les échantillons ont été analysés sur gel d'agarose/BrEt et l'intensité des amplifications a été mesurée avec le Fluor-S™ MultiImager (BioRad) et le logiciel Quantity One™. Afin de tenir compte des petites variations de niveau d'amplification du standard externe entre les différents échantillons, les niveaux de transcription de *wak1* en présence d'acide salicylique ont été exprimés par le rapport entre l'intensité de l'amplification de *wak1* et l'intensité des amplifications de l'ubiquitine. Pour faciliter l'analyse, nous avons attribué au témoin la valeur de référence 100 % et les valeurs des autres échantillons ont été calculés par rapport à ce témoin (**Fig.43C**). Par la suite, toutes les réactions de RT-PCR seront analysées de la même façon. Le profil d'intensité des amplifications étant le même dans le cas des plantes traitées 24 ou 48 heures, seuls les résultats obtenus pour le traitement de 48 heures seront présentés (**Fig.43**).

Les plantes traitées à l'acide salicylique présenteraient un taux de messagers *wak1* beaucoup plus important que les plantes témoins non induites. En effet, l'intensité des amplifications sur l'ADNc des plantes traitées durant 48 heures était environ 1.7 fois plus importante que le témoin pour les concentrations de 0.5 mM et de 0.2 mM d'acide salicylique. Une légère diminution de l'intensité de l'amplification (158 %) a été détectée lorsque la concentration en acide salicylique diminuait (0.05 mM).

Il est également intéressant de noter que malgré les fortes variations observées au niveau des amplifications de *wak1*, les amplifications de l'ubiquitine restaient parfaitement constantes quelle que soit la concentration d'acide salicylique appliquée aux plantes. Le choix de l'ubiquitine comme standard semble donc être judicieux et les variations d'intensité observées lors de l'amplification étaient bien dues à des modifications au niveau de la quantité des transcrits et non à des différences de pureté ou de concentrations d'ARN entre les lots.

Maintenant que nous disposons d'un protocole de RT-PCR « semi-quantitative » fonctionnel, nous allons analyser l'impact de différents agents pharmacologiques et traitements sur l'expression de *wak1* chez *Arabidopsis thaliana*.

b) Choix des substances testées

Les substances testées au cours de ce mémoire ont été classées en trois catégories (Fig.44) :

- Constituants de la paroi cellulaire et enzymes pectolytiques
- Messagers secondaires
- Modulateurs de kinases

Dans un premier temps, l'utilisation d'acide polygalacturonique, d'oligogalacturonides et de pectinase a pour objectif de vérifier si *wak1* est capable de percevoir des perturbations au niveau de la paroi.

Dans un deuxième temps, l'utilisation de messagers secondaires (calcium ou peroxyde d'hydrogène) permettra de savoir si ces messagers secondaires font partie des voies de signalisation empruntées par le signal « WAK1 ».

Dans un troisième temps, l'utilisation de modulateurs de kinases permettra de vérifier l'intervention de protéines kinases dans la voie d'activation transcriptionnelle de *wak1*.

c) Effet de constituants de la paroi végétale et d'enzymes pectolytiques sur la transcription de *wak1*

i. Généralités sur l'acide polygalacturonique et les oligogalacturonides

L'acide polygalacturonique est le constituant principal des pectines de la paroi cellulaire. Les pectines sont des polysaccharides hydratés constitués de régions lisses (acide homopolygalacturonique) et de régions branchées (rhamnogalacturonane, *Carpita et al., 1993 ; Fig.45*). Les régions lisses de la pectine ont la propriété de pouvoir s'associer coopérativement en présence d'ions bivalents (notamment le calcium) pour former dans la paroi un réseau décrit par le modèle « egg-box » (*Morris et al., 1982 ; Fig.46*).

Lorsque la pectine est hydrolysée par des enzymes pectolytiques de l'agent pathogène, des fragments de pectine, appelés oligogalacturonides, sont libérés. Ces derniers modulent une série de réponse chez la plante dont la réponse de défense lorsqu'ils sont présents à des concentrations de l'ordre de 10^{-4} M (*Messiaen, J., 1994b*). Les oligogalacturonides de degré de polymérisation supérieur ou égal à 9 ($DP \geq 9$) activent, par exemple, la synthèse de phytoalexines et favorisent la lignification de la paroi (*Buchanan, Gruissem and Jones, 2000*). L'activité biologique des oligogalacturonides de $DP \geq 9$ est strictement liée à la formation de dimères en présence de calcium. Cette faculté n'est pas partagée par les oligogalacturonides de degré de polymérisation < 9 .

ii. Effet de l'acide polygalacturonique (PGA) et des oligogalacturonides sur la transcription de *wak1*

Les récepteurs WAK étant associés à des constituants de la paroi (*Kohorn et al., 2001*), il est probable que ces protéines soient capables de percevoir des modifications pariétales impliquant des polysaccharides. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré l'effet de l'ajout d'acide polygalacturonique et d'oligogalacturonides divers sur la transcription de *wak1*. Nous avons enfin simulé une attaque pathogène en traitant les plantes avec des pectinases.

Des plantes ont, dans un premier temps, été traitées par de l'acide polygalacturonique à deux concentrations différentes (0.1 mg/ml et 1 mg/ml) pendant 2, 6 et 24 heures. Les concentrations en PGA utilisées ont été choisies en fonction de résultats déjà obtenus au laboratoire (*Messiaen et al., 1993 et 1994a*). A la concentration de 0.1 mg/ml en acide polygalacturonique, nous n'avons pas mis en évidence de modifications du nombre de transcrits par rapport au témoin (données non montrées).

Par contre, le PGA, à une concentration de 1 mg/ml, provoque une diminution du nombre de transcrits *wak1* (15%) après 6 heures de traitement (**Fig.47**). Cet effet est transitoire puisqu'il n'est quasiment plus visible après 24 heures.

Le PGA étant une grosse molécule (DP moyen = 36) qui passe difficilement la paroi végétale quand elle est appliquée de façon exogène, il est difficile de dire si l'effet observé est effectivement dû à la présence d'acide polygalacturonique. Des expériences similaires, mais réalisées sur des protoplastes d'*Arabidopsis thaliana*, permettraient de confirmer ou d'infirmer l'effet inhibiteur de l'acide polygalacturonique.

Dans un deuxième temps, des plantes ont été traitées avec des oligogalacturonides aux concentrations de 0.2 et 0.5 mg/ml pendant 2 et 6 heures. Deux fractions oligosaccharidiques ont été testées : les oligomères de $DP < 9$ et les oligomères de $DP \geq 9$. Ces tests ont été réalisés dans des conditions salines favorisant la dimérisation des oligomères en présence d'ions calcium.

De manière générale, les quantités de transcrits mesurées étaient toutes supérieures au témoin (sauf pour l'échantillon traité avec 0.5 mg/ml d'oligogalacturonides pendant 6 heures) laissant supposer une activation de la transcription de *wak1* en réponse à la présence d'oligogalacturonides de $DP <$ ou \geq à 9 (**Fig.48**). Malgré cela, les réponses aux 2 types d'oligogalacturonides ($DP <$ ou \geq à 9) étaient différentes. En effet, pour les deux concentrations testées avec des oligogalacturonides de $DP < 9$, nous avons observé une augmentation de la quantité de transcrits au cours du temps par rapport au témoin non traité (118 % après 2 heures et 136 % après 6 heures de traitement pour la concentration de 0.2 mg/ml d'oligos de $DP < 9$). Par contre, pour les oligogalacturonides de $DP \geq 9$, le niveau de transcrits était plus élevé après 2 heures de traitement qu'après 6 heures (125 % après 2 heures et 118 % après 6 heures pour la concentration de 0.2 mg/ml).

Ces résultats sont intéressants car, jusqu'à présent, seuls les oligogalacturonides de $DP \geq 9$ étaient reconnus comme ayant un pouvoir éliciteur. Nous montrons ici que les oligogalacturonides de $DP < 9$ possèdent également une activité biologique et ont, tout comme les oligos de $DP \geq 9$, le pouvoir d'induire la transcription de *wak1*.

Pour investiguer d'avantage l'effet de perturbations pariétales sur l'expression transcriptionnelle de *wak1*, nous avons simulé une attaque pathogène en traitant les plantules d'*Arabidopsis thaliana* avec des pectinases d'*Aspergillus niger*.

iii. Effet des pectinases sur la transcription de *wak1*

Des plantes ont été traitées avec plusieurs activités de pectinase choisies arbitrairement: 14.25 mg/ml (0.57 U/ml), 28.50 mg/ml (1.14 U/ml) et 356.25 mg/ml (14.28 U/ml). Ces enzymes ont été appliquées pendant 2, 6 et 24 heures.

Aux faibles activités (0.57 U/ml et 1.14 U/ml), les pectinases ne sembleraient pas exercer d'effet (Résultats en annexes 1 et 2). Seuls les résultats obtenus avec une concentration de 14.28 U/ml sont présentés (**Fig.49**). Ce traitement provoquerait une nette augmentation du nombre de transcrits dans les 2 heures qui suivent le traitement (136%). Le processus était transitoire mais encore visible à 6 heures (124%). A 24 heures, le niveau de transcrits était quasiment revenu au niveau du témoin non traité (106%).

Cette expérience confirme les résultats obtenus avec les oligogalacturonides de DP < ou \geq à 9 puisque les pectinases hydrolysent la pectine en oligomères de degré < ou \geq à 9. En effet, après 2 heures de traitement, aussi bien dans le cas des oligogalacturonides de DP < 9 que dans le cas des oligos de DP \geq 9, nous avons observé une augmentation de la transcription de *wak1* similaire à celle observée dans le cas d'un traitement aux pectinases.

Ces résultats confirment, d'une part, le rôle éliciteur des oligogalacturonides et, d'autre part, l'importance de l'intégrité de la paroi cellulaire dans la voie de transduction du signal menant à l'activation transcriptionnelle de *wak1*.

Après avoir investigué l'effet de substances dérivées ou agissant sur la paroi cellulaire, nous allons maintenant étudier l'impact de différents messagers secondaires et modulateurs de kinases sur la transcription de *wak1*.

d) Effet de messagers secondaires sur la transcription de *wak1*

i. Effet du peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est une des premières substances à être libérée lors d'une attaque par un pathogène. Les rôles du peroxyde d'hydrogène sont multiples (cfr I.4.a., p16). Il active notamment la benzoate hydroxylase, la dernière enzyme de la voie de biosynthèse de l'acide salicylique. L'application de peroxyde d'hydrogène conduisant à une augmentation de la synthèse d'acide salicylique endogène, cette expérience devrait permettre de confirmer le rôle de l'acide salicylique dans la voie de régulation de *wak1* et ceci sans recourir à l'utilisation d'acide salicylique exogène.

Des plantes ont été traitées pendant 4, 6 et 24 heures avec 2 mM d' H_2O_2 . La figure 50 montre que le peroxyde d'hydrogène provoque une forte augmentation de la quantité de transcrits *wak1* dès 4 heures (192 %). Cette réponse se prolonge après 6 heures de traitement (296 %). L'effet est toujours présent après 24 heures (215 % d'augmentation par rapport au témoin non traité).

Nous avons déjà pu observer une augmentation de la quantité de transcrits de *wak1* suite à l'application d'acide salicylique exogène. L'augmentation observée en présence de peroxyde d'hydrogène n'est de ce fait pas surprenante puisque ce dernier active la synthèse d'acide salicylique. L'impact apparemment plus important de l' H_2O_2 sur la transcription de *wak1* est soit dû à un effet « concentration », soit dû au fait que le peroxyde d'hydrogène a de multiples effets aussi bien dans la cellule que dans la paroi cellulaire (cfr I.4.a., p16). Dans le cas où cette dernière hypothèse s'avèrerait exacte, elle ouvre la voie à une régulation de la transcription de *wak1* via plusieurs cascades de transduction du signal.

ii. Effet du calcium

Pour mesurer l'effet d'une variation de l'activité en calcium cytosolique sur la transcription de *wak1*, nous avons utilisé la calcimycine, un ionophore spécifique du calcium. Des études antérieures ont montré que la calcimycine pouvait partiellement mimer les effets des oligogalacturonides de $\text{DP} \geq 9$ (Messiaen et al., 1994b). C'est la raison pour laquelle des plantes d'*Arabidopsis thaliana* ont été traitées, dans un premier temps, avec de la calcimycine à une concentration de 50 μM . Dans le cas où les plantes sont traitées uniquement avec de la calcimycine (Fig.51, pistes 10 et 11), on n'observe pas d'augmentation des taux de transcrits par rapport au témoin non traité (Fig.51, piste 1).

Afin de mettre en évidence une éventuelle synergie entre le calcium et les oligogalacturonides, les plantes ont été traitées aux oligopectates de $\text{DP} < \text{ou} \geq 9$ à une concentration de 0.2 mg/ml pendant 2 heures puis ces plantes ont été traitées avec de la calcimycine pendant 10 min, 30 min et 2 heures.

L'effet activateur des oligogalacturonides de $\text{DP} < 9$ a été observé comme précédemment (Fig.48) mais l'augmentation du nombre de transcrits est légèrement inférieure. Lorsque les plantes ont été traitées avec des oligogalacturonides de degré de polymérisation inférieur à 9 puis à la calcimycine 30 minutes (Fig.51, piste 4), une augmentation de 10 % a été observée par rapport au témoin induit uniquement avec des oligogalacturonides de $\text{DP} < 9$ (Fig.51, piste 2). Cette augmentation est transitoire puisqu'elle n'est plus que de 5 % après 2 heures de

traitement à la calcimycine. Nous observons, par contre, qu'aucune modification du nombre de transcrits n'est induite en réponse à la calcimycine pour les échantillons traités avec les oligos de $DP \geq 9$ (Fig.51, pistes 7 à 9).

Au terme de ces résultats, il est difficile de conclure qu'une synergie existe entre les oligogalacturonides et le calcium au sein de la voie de transduction menant à l'activation transcriptionnelle de *wak1*. On observe bien une augmentation du taux de transcrits après 6 heures de traitement aux oligogalacturonides de $DP < 9$ suivi d'un traitement à la calcimycine durant 30 min mais, comme la calcimycine seule n'a pas d'effet, il semblerait que l'augmentation du taux de transcrits observée soit due aux oligogalacturonides de $DP < 9$ plutôt qu'à la calcimycine.

e) Effet des modulateurs de kinases sur la transcription de *wak1*

Dans les expériences suivantes, nous testons l'hypothèse que des protéines impliquées dans la régulation de la transcription de *wak1* soient modulées par phosphorylation.

i. Effet d'un activateur de kinases

Nous avons choisi d'étudier l'effet du phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), un activateur de la phosphokinase C (PKC). L'existence de véritables PKC chez les plantes a été démontrée récemment (Sopory *et al.*, 1998). Celles-ci seraient impliquées dans l'activation de facteurs de transcription PRB1 et PRB2 contrôlant la transcription de certains gènes codant pour des protéines PR.

Des plantes ont été traitées avec du PMA à une concentration de $10^{-5}M$ pendant 6, 16 et 24 heures. Cette concentration a été choisie sur base des travaux de Sopory *et al.* (1996 et 1998).

La présence de cet activateur de kinase ne semblerait pas modifier le taux de transcrits de *wak1* puisque les taux de transcrits, quelque soit le temps du traitement, restaient identiques par rapport au témoin non traité (Résultats en Annexe 3).

ii. Effet des inhibiteurs de kinases

Nous avons ensuite testé l'effet d'inhibiteurs de kinases. Le premier testé est le 1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)-2-méthylpiperazine ou H-7 (Sopory *et al.*, 1996). Cette molécule est un inhibiteur spécifique de la phosphokinase C et des kinases dépendantes de nucléotides

cycliques. Les plantes ont été traitées pendant 6, 16 et 24 heures aux concentrations de 10^{-5}M et 10^{-7}M (Sopory *et al.*, 1996 et 1998).

L'application de H-7 à une concentration de 10^{-5}M (Fig.52) induisait une diminution transitoire de l'ordre de 15 % de la quantité de transcrits dès 6 heures de traitement. A 16 heures, la diminution n'était plus que 8 %, et après 24 heures de traitement, nous pouvons considérer que le niveau de transcrits était identique au témoin non traité. Une diminution est également observée lorsque les plantes sont traitées avec une concentration de 10^{-7}M (Fig.53), mais celle-ci semble moins transitoire puisqu'à 24 heures, nous observons toujours une diminution du nombre de transcrits de l'ordre de 10 % par rapport au témoin non traité.

Pour confirmer l'effet des inhibiteurs de kinases, un second inhibiteur a été testé : le diméthylaminopurine (DMAP), qui n'est pas spécifique d'un type de kinase particulière. Les plantes ont été traitées dans les mêmes conditions que pour le H-7.

Les résultats de la RT-PCR réalisée sur l'ADNc de plantes traitées avec une concentration de 10^{-5}M en DMAP sont présentés en figure 54. Nous avons constaté une nette diminution du taux de transcrits après 6 heures de traitement (30% de diminution par rapport au témoin). Celle-ci était transitoire puisqu'après 16 heures, le taux de messenger des plantes traitées redevient quasiment similaire à celui des plantes témoin (95%). Le profil de variation obtenu pour le traitement avec une concentration de 10^{-7}M de DMAP était similaire mais la diminution des niveaux de transcrits est moins forte par rapport au traitement avec une concentration de 10^{-5}M (Fig.55). Ainsi, les deux inhibiteurs de kinases testés ont pour effet de diminuer le niveau de transcrits de *wak1* suggérant l'intervention de kinase dans les cascades d'évènements menant à l'activation transcriptionnelle de *wak1*.

f) Conclusion générale concernant l'analyse des variations des taux de transcrits de *wak1*

Au terme de cette première partie du travail consacrée à l'analyse des variations du taux de transcription de *wak1*, nous pouvons conclure que les oligogalacturonides de $\text{DP} < 9$ et de $\text{DP} \geq 9$, les pectinases, le peroxyde d'hydrogène et l'acide salicylique sont capables d'induire la transcription du gène *wak1*. Les deux inhibiteurs de kinases testés (H-7 et DMAP) et, dans une moindre mesure, l'acide polygalacturonique diminuent la transcription du gène *wak1*. Enfin, l'ionophore spécifique du calcium testé, la calcimycine, n'a pas d'effet sur le taux de transcrits de *wak1*.

D'un point de vue pratique, le fait que les amplifications de l'ubiquitine restent constantes dans la plupart des traitements, nous incite à dire que la RT-PCR « semi-

quantitative » avec l'ubiquitine comme standard externe est une méthode d'analyse permettant une analyse satisfaisante des variations du taux de transcription d'un gène. Des expériences supplémentaires seront cependant nécessaires pour confirmer les résultats obtenus et définir un intervalle de confiance pour chaque mesure du niveau de transcrits de *wak1*. La lourdeur de notre protocole expérimental ne nous a pas permis de réaliser celles-ci.

Maintenant que nous savons que certaines molécules peuvent influencer le niveau de transcrits de *wak1*, nous allons mesurer l'impact de ces mêmes substances sur la quantité de protéine WAK1 dans des plantules d'*Arabidopsis thaliana*.

4. Etude des variations de la quantité de protéines WAK1

L'analyse des variations de la quantité de protéine WAK1 a été réalisée au moyen d'un anticorps polyclonal anti-WAK1 en dot blot et en western-blot.

L'obtention de matériel végétal ainsi que l'application des traitements ont été effectués dans les mêmes conditions que pour les expériences de mise en évidence des variations des taux de transcrits *wak1* (Fig.36). Seuls les traitements qui ont induit une variation du taux de transcrits de *wak1* seront testés au cours de ces expériences. Cette analyse nécessite, dans un premier temps, une mise au point de conditions expérimentales permettant de détecter spécifiquement la protéine WAK1 dans un extrait total de protéines d'*Arabidopsis thaliana*. Dans un second temps, une analyse comparative de la quantité de protéines WAK1 a été réalisée pour les divers échantillons traités avec les substances citées précédemment.

a) Mise au point des conditions d'utilisation des anticorps anti-WAK1

i. Historique de la production des anticorps polyclonaux

Des anticorps polyclonaux de lapin disponibles au laboratoire ont été utilisés lors de ces expériences. Le polysérum a été produit au départ de protéines recombinantes issues d'un fragment d'ADN spécifique de *wak1* surexprimé dans *E. coli* au moyen du système pET (Novagen).

Avant d'utiliser le polysérum pour détecter WAK1 en western-blot, une étape préliminaire de mise au point a été nécessaire. Celle-ci consiste à définir les conditions de dilutions et d'épuisement du polysérum adéquates pour obtenir une réponse optimale vis-à-vis de la protéine WAK1.

ii. Test des anticorps en dot-blot

Le dot-blot est une technique rapide qui nous a permis de déterminer les conditions d'épuisement et les quantités de protéines à utiliser pour les analyses en western-blot. L'épuisement optimal du polysérum consiste à mettre en présence le polysérum et des protéines d'*E. coli* afin que tous les anticorps non spécifiques de la protéine WAK1 soient neutralisés.

Afin d'établir les meilleures conditions de détection spécifique de WAK1, nous avons procédé à un dot-blot en testant une série de dilutions du sérum et de la fraction protéique totale d'un clone d'*E. coli* BL21 surexprimant un fragment de la protéine CrebB, qui servira de protéine contrôle (Draye, 1998). Le polysérum épuisé a été testé contre quatre fractions protéiques : la protéine WAK1 purifiée, une fraction protéique totale d'*E. coli* contenant la protéine WAK1, la protéine contrôle servant de témoin négatif purifiée et une fraction protéique totale d'*E. coli* contenant la protéine contrôle (Fig.56).

Pour chacune des conditions expérimentales, le polysérum reconnaissait la fraction purifiée ou brute de la protéine WAK1. Par contre, il ne reconnaissait pas la protéine contrôle purifiée utilisée comme témoin négatif. Ce résultat signifie que le polysérum ne contient pas d'anticorps dirigés contre le Tag de la protéine contrôle et qu'il est bien spécifique de WAK1.

Enfin, nous remarquons, de manière générale, une absence quasi totale de bruit de fond signifiant que les épuisement testés permettent une bonne neutralisation des anticorps vis à vis des protéines d'*E.coli*.

Après cette mise au point, nous procédons à un essais de détection en western-blot de la protéine WAK1 sur un extrait total de protéines d'*Arabidopsis thaliana*

iii. Mise au point de la détection de WAK1 en western-blot

Le premier test des anticorps en western-blot a été réalisé sur des plantes âgées d'environ 1.5 mois. Le choix de ce matériel s'est avéré nécessaire afin de ne pas puiser dans la réserve de notre matériel végétal de référence (des plantules de 2 semaines) pour effectuer la mise au point de la technique. Le protocole utilisé pour l'extraction des protéines végétales est celui décrit par Kohorn et al. (1996). La protéine WAK1 étant une protéine transmembranaire associée à des constituants de la paroi, un tampon d'extraction spécifique contenant 4 % de SDS est nécessaire à l'isolement de cette protéine (cfr II.3.a, p43). Un extrait de protéines totales d'*Arabidopsis thaliana* a ensuite été déposé sur gel d'acrylamide 12 % puis analysées en western-blot à l'aide des anticorps anti-WAK1 (Fig.57). Nous avons

déecté plusieurs bandes avec le polysérum anti-WAK1 : deux bandes sont observées à une taille comprise entre 250 kDa et 150 kDa et deux autres bandes, d'intensité nettement plus faible, entre 50 et 75 kDa (**Fig.57**). D'après les résultats publiés (*Kohorn et al., 1996*), la protéine WAK1 possède un poids moléculaire de 68 kDa. Cependant, des expériences ultérieures ont mis en évidence que WAK1 était susceptible de former des complexes avec d'autres protéines dont le poids moléculaire de ceux-ci est compris entre 100 et 250 kDa (*Park et al., 2001*). Les bandes que nous avons mis en évidence dans nos extraits pourraient donc correspondre à ces complexes.

Au terme ces tests préliminaires, nous allons pouvoir utiliser les anticorps anti-WAK1 sur notre matériel végétal de référence, c'est à dire des plantes âgées de deux semaines cultivées dans les conditions préalablement décrites et traitées avec de l'acide salicylique, des pectinases, du peroxyde d'hydrogène ou du diméthylaminopurine.

b) Quantification des protéines WAK1 suite à différents traitements

Les différents traitements réalisés sont les suivants : acide salicylique (48 heures aux concentrations de 0.5, 0.2 et 0.05 mM), au peroxyde d'hydrogène (4, 6 et 24 heures à une concentration de 2 mM), au DMAP (6, 16 et 24 heures à une concentration de 10^{-5} M) et aux pectinases (2, 6 et 24 heures à une concentration de 14.28 U/ml). Une étape préliminaire à la quantification a été de doser les protéines végétales afin de déposer des quantités équivalentes de celles-ci en western-blot. Cette quantification a été réalisée par la méthode de Bradford sur des échantillons de protéines totales d'*Arabidopsis thaliana*.

i. Essais de quantification sur notre matériel de référence

Un premier test a été réalisé sur des plantules de deux semaines induites à l'acide salicylique pendant 48 heures aux concentrations de 0.5, 0.2 et 0.05 mM.

Dans un premier temps, les protéines totales des plantes traitées à l'acide salicylique ont été extraites, dialysées puis dosées selon la méthode décrite précédemment. Une quantité équivalente de protéines (20 µg) a ensuite été déposée sur gel SDS-PAGE 12 % pour chacun des extraits puis analysées en western-blot grâce au polysérum. Les résultats, présentés en figure 58, montrent que le polysérum anti-WAK1 permet la détection de deux à trois bandes de très faible intensité situées entre les marqueurs de poids moléculaires de 50 et 75 kDa, ce qui pourrait correspondre à la forme non complexée de WAK1. La présence de plusieurs

bandes pourraient être due à des protéines WAK1 ayant subi des modifications post-traductionnelles (glycosilation, par exemple).

Dans le but d'optimiser la détection de WAK1 dans les extraits végétaux, nous avons tenté de concentrer les échantillons sur une colonne microcon YM30 (amicon). Après dosage des échantillons concentrés, des quantités équivalentes de protéines (200 µg) ont été déposées sur un gel d'acrylamide 12 % et analysées en western-blot avec le polysérum anti-WAK1.

Bien que de très faible intensité, nous détectons deux bandes comprises entre les marqueurs de poids moléculaire 50 et 75 kDa (**Fig.59**). Cependant, la présence de trainées empêche la quantification des signaux. Ces trainées doivent probablement être dues à un problème de solubilisation de WAK1 également mentionné par Kohorn et al. (1996).

Enfin, les différences observées entre les plantes jeunes (**Fig.58**) et âgées (**Fig.57**) semblent indiquer que la formation de complexes protéiques de hauts poids moléculaires impliquant WAK1 pourrait être dépendante d'un état de développement de la plante.

ii. *Analyse des quantités de protéines en dot-blot*

Afin de contourner les problèmes rencontrés lors de la migration des extraits protéiques, nous allons tenter de quantifier les variations des quantités de protéine WAK1 en dot-blot.

Une quantité équivalente d'extrait protéique concentré (20 µg) a été déposé sur une membrane de nitrocellulose et analysée en présence du polysérum anti-WAK1. La quantification des signaux des spots a été réalisée par analyse densitométrique au moyen du Fluor-S™ Max Imager (Bio-Rad). Nous avons pu mettre en évidence une nette augmentation de la quantité de protéines WAK1 dans le cas des plantes traitées à l'acide salicylique pendant 48 heures à une concentration de 0.5 et 0.2 mM par rapport au témoin (225 et 185 % respectivement, **Fig.60A**). Une augmentation a également été observée dans le cas du peroxyde d'hydrogène (147 et 135 % après 4 et 6 heures respectivement, **Fig.60B**). Dans le cas des plantes traitées au DMAP, on détecte une diminution de la quantité de protéines WAK1 après 6 et 16 heures de traitement (68 et 72 % respectivement, **Fig.60C**) et une disparition quasi totale de celle-ci après 24 heures (94 %). Enfin, on ne détecte quasiment pas d'augmentation de la quantité de protéines WAK1 lors du traitement aux pectinases (12 % après 2 heures de traitement, **Fig.60D**).

c) Conclusion générale concernant l'analyse des variations des quantités de protéines

Au terme de cette deuxième partie de travail, nous avons réussi à mettre en évidence, grâce à la technique de dot-blot, une variation de la quantité de protéines WAK1 lors d'un traitement à l'acide salicylique, au peroxyde d'hydrogène et au DMAP. Ces résultats peuvent être partiellement corrélés avec ce que nous avons observé au niveau transcriptionnel. En effet, dans le cas de l'acide salicylique, le profil de variation des quantités de protéines est le même que celui observé au niveau des amplification RT-PCR au départ d'ARN de plantes traitées dans les mêmes conditions. Pour ce qui est du peroxyde d'hydrogène et du DMAP, le profil de variation des quantités de protéines WAK1 est sensiblement différent que le profil observé en RT-PCR, mais on retrouve cependant bien une augmentation dans le cas du peroxyde d'hydrogène et une diminution dans le cas du DMAP. Par contre, l'augmentation du taux de transcrits *wak1* observée dans le cas d'un traitement aux pectinases n'est pas corrélée avec une augmentation de la quantité de protéine WAK1 en dot-blot.

Finalement, nous avons constaté, de manière fortuite, que la protéine WAK1 faisait probablement partie de complexes de hauts poids moléculaires dont la formation serait fonction de l'âge de la plante.

V

Discussion générale

V

Discussion générale

V Discussion générale

Les objectifs de ce mémoire étaient d'utiliser différents modulateurs agissant sur les voies d'activation transcriptionnelle et traductionnelle de WAK1 dans le but d'identifier des intermédiaires de transduction du signal impliqués dans la régulation de WAK1.

Par cette étude, nous avons montré que les oligogalacturonides, les pectinases et le peroxyde d'hydrogène étaient impliqués dans la voie de transduction du signal menant à l'activation de la transcription de *wak1*. Nous avons également montré que les inhibiteurs de kinases étaient capables de diminuer le taux de transcrits de *wak1*. Enfin, les analyses faites au niveau traductionnel montrent que les cinétiques d'augmentation (ou de diminution) de la quantité de protéines WAK1 pouvaient être corrélées avec celles observées pour les taux de transcrits dans le cas des plantes traitées avec de l'acide salicylique, du peroxyde d'hydrogène et du diméthylaminopurine.

Dans cette discussion générale, nous essayerons d'intégrer nos résultats dans un schéma de régulation de WAK1 tout en y ajoutant des données de la littérature.

L'effet des oligogalacturonides sur la transcription de *wak1* est intéressant à plusieurs points de vues. Tout d'abord, nous avons montré que les oligogalacturonides de degré de polymérisation inférieur à 9 augmentaient le taux de transcrits de *wak1*. Il semblerait donc que les oligogalacturonides de $DP < 9$ interviennent dans la signalisation cellulaire alors que ce rôle est habituellement attribué aux oligogalacturonides de $DP \geq 9$. A l'heure actuelle, le seul effet physiologique connu des oligogalacturonides de $DP < 9$ est d'activer la synthèse d'inhibiteurs de protéinase chez la tomate (Thain *et al.*, 1990). Par cette étude, nous montrons que les oligogalacturonides de $DP < 9$ interviennent également dans la cascade d'évènements menant à la transcription de *wak1*.

Les oligogalacturonides de $DP < 9$ ou $DP \geq 9$ semblent également agir de façons différentes. En effet, la cinétique d'augmentation du nombre de transcrits de *wak1* n'est pas la même en présence d'oligogalacturonides de $DP < 9$ ou $DP \geq 9$. Dans le premier cas, nous détectons une augmentation après deux heures de traitement qui se poursuit après 6 heures tandis que dans le deuxième cas, après une phase durant laquelle le nombre de transcrits augmente, nous

observons une diminution de celui-ci. Bien que cette différence pourrait être due à une différence de diffusion de chaque molécules dans la paroi, elle pourrait aussi être le reflet d'une perception différente de l'état d'intégrité de la paroi cellulaire. On peut ainsi imaginer que la présence d'oligogalacturonides de $DP < 9$ soit le signe pour la cellule d'une paroi très endommagée due à la présence d'un pathogène particulièrement efficace dans son entreprise de destruction de la paroi. Les oligogalacturonides de $DP < 9$ entraîneraient donc une augmentation de la transcription de *wak1* dans le but d'activer de façon rapide et exponentielle une série de gènes de défense. Si WAK1 assure, en plus, une fonction de récepteur, les oligogalacturonides de $DP < 9$ pourraient aussi doter la cellule d'une faculté accrue de perception de l'agent pathogène.

Les oligogalacturonides de $DP \geq 9$ seraient, quant à eux, indicatifs de la présence d'un pathogène moins « virulent » ou d'un état faiblement dégradé de la paroi (favorisée, par exemple, par la présence de PGIP). Le taux de transcrits de *wak1* serait ainsi moins élevé. Dans ce cas, les oligogalacturonides de $DP \geq 9$ auraient le temps d'activer, en plus, d'autres voies de transduction du signal déjà identifiées au laboratoire (Messiaen, 1994b).

Nous avons confirmé l'effet activateur des oligogalacturonides grâce à divers traitements avec des pectinases. En effet, ces enzymes clivent les liaisons α -1,4 de l'acide polygalacturonique et libèrent des α -1,4-oligogalacturonides. Le traitement avec les pectinases montre que le profil d'augmentation du nombre de transcrits de *wak1* est similaire à celui observé pour les oligogalacturonides de $DP \geq 9$.

Des travaux réalisés par Kohorn (2001) ont montré que WAK1 pouvait être détachée de la paroi suite à un traitement pectolytique suggérant un « lien » entre WAK et les pectines de la paroi. La rupture de ce lien et/ou la libération d'oligogalacturonides dans la paroi pourraient être perçus comme des signaux par WAK1 et/ou d'autres récepteurs membranaires impliqués dans les réponses de défense de la plante.

Après avoir mesuré l'impact d'une série de substances issues ou agissant sur la paroi, nous nous sommes focalisés sur l'effet de messagers secondaires et de modulateurs de kinases.

Dans un premier temps, nous avons montré que le peroxyde d'hydrogène induit une augmentation plus élevée de la transcription de *wak1* qu'en présence d'acide salicylique (cfr plus loin). Ces résultats ne sont pas surprenants car le peroxyde d'hydrogène active, en effet,

la dernière enzyme de la voie de biosynthèse de l'acide salicylique et conduit à une augmentation de la concentration en acide salicylique endogène. La différence de niveau de transcrits observée suite aux deux traitements est probablement due au fait que le peroxyde d'hydrogène induit également des modifications paritétales et membranaires (« cross-linking » de protéines paritétales et peroxydation lipidique entre autres) qui pourraient être détectées par WAK1 ou par d'autres récepteurs qui initieraient une voie de transduction menant à la régulation transcriptionnelle de WAK1.

Dans un second temps, nous avons tenté de mettre en évidence un effet du calcium sur le taux de transcrits de *wak1*. Des travaux antérieurs avaient, en effet, montré que les oligogalacturonides de $DP \geq 9$ initiaient une voie de transduction du signal impliquant le calcium (Messiaen, 1992b). Aucun effet de l'ionophore spécifique du calcium testé n'a cependant pu être mis en évidence sur la régulation de la transcription de *wak1*. Dans notre cas, l'effet des oligogalacturonides de $DP \geq 9$ (ainsi que les oligogalacturonides de $DP < 9$) sur le taux de transcrits de *wak1* permet d'émettre l'hypothèse que ceux-ci agiraient sur la transcription de *wak1* selon une autre voie qui serait indépendante du calcium.

Enfin, nous avons confirmé l'effet de l'acide salicylique sur l'augmentation du taux de transcrits de *wak1* (Kohorn et al., 1998). Nous avons aussi montré que l'acide salicylique induisait une augmentation de la quantité de protéines en corrélation avec l'augmentation des taux de transcrits.

L'acide salicylique est décrit comme agissant de façon positive sur un régulateur cellulaire important, NPR1 (Kohorn et al., 1998), via l'activation d'une MAPK, cible potentielle des inhibiteurs de kinases utilisés (SIPK, salicylic acid induced protein kinase, Meskiene et al., 2000). NPR1 présente une forte analogie avec I κ B (Ryals et al., 1997) et contrôle une série de gènes de défense dont les gènes *PR* (Klessig et al., 1996) et *wak1* (Kohorn et al., 1998). Il semblerait également que WAK1 exerce un feedback positif sur NPR1 pour induire son auto-activation (Kohorn et al., 1998). Ceci est un phénomène particulier dans les voies de transduction du signal car, très souvent, le récepteur est inactivé pour empêcher une activation de la cellule trop longue. Des cas similaires sont aussi observés chez les cellules animales où les récepteurs aux facteurs de croissance induisent leur propre

synthèse en présence de leur ligand. C'est par exemple le cas du récepteur au TGF β , le seul récepteur à sérine-thréonine kinase des cellules animales (Mulder *et al.*, 2000).

Une hypothèse proposée par Kohorn *et al.* (1998) pour expliquer l'influence de l'acide salicylique sur WAK1 serait que cette protéine serait indispensable pour que la plante puisse tolérer les concentrations élevées en acide salicylique libérées en cas d'attaque par un pathogène. Ainsi, tout ce qui conduit à la production de ce composé dans la plante (peroxyde d'hydrogène ou oligogalacturonides de DP \geq 9) ou tout ce qui mime la présence d'un pathogène (oligogalacturonides de DP $<$ 9 ou pectinase) conduit à l'augmentation du taux de transcrits de *wak1* et de protéines WAK1. WAK1 pourrait, par exemple, initier une voie de transduction du signal menant à la diminution de la toxicité exercée par l'acide salicylique soit en favorisant la dégradation de celui-ci soit en provoquant son inactivation sous forme de glucoside. WAK1 pourrait être nécessaire en quantité plus importantes dans les cellules bordant les cellules infectées par un pathogène pour que celles-ci puissent faire face aux composés toxiques libérés par ces dernières. Ainsi, seules les cellules infectées seraient tuées par des concentrations élevées en acide salicylique. WAK1 pourrait ainsi jouer un rôle important dans la réponse SAR en autorisant la présence d'acide salicylique dans les zones éloignées du site d'infection où il jouerait le rôle de messenger secondaire à des concentrations beaucoup plus faibles. Celles-ci seraient suffisantes pour induire une série de gènes de défense à distance, mais seraient dépourvues de toxicité.

Dans un dernier temps, nous avons montré qu'un activateur de la PKC n'induisait pas la transcription de *wak1*, ce qui serait concordant avec une voie de régulation indépendante du calcium. Nous avons également observé que deux inhibiteurs de kinases (le DMAP et l'H-7) entraînent une diminution du taux de transcrits de *wak1* suggérant une régulation de sa transcription par des kinases. Ces résultats préliminaires nécessitent néanmoins une vérification en utilisant d'autres modulateurs de nature chimique différente mais agissant sur une même cible. Cette précaution est à prendre lorsque l'on travaille avec des cellules végétales qui n'ont pas nécessairement les mêmes intermédiaires de transduction du signal que les cellules animales chez qui l'action des modulateurs est généralement décrite.

Un schéma illustrant le mode de régulation hypothétique de WAK1 sur base des résultats obtenus et intégrant des données bibliographiques (*Kohorn et al., 1998 ; Ryals et al., 1997 ; Klessig et al., 1996*) est présenté en figure 61. Les substance utilisées au cours de ce mémoire sont encadrées et les interactions citées dans la littérature y sont indiquées en rouge.

En présence d'un agent pathogène pectolytique, l'acide polygalacturonique est clivé par des pectinases en fragments plus petits, appelés oligogalacturonides. Les voies de transduction du signal activées par les oligogalacturonides de DP < ou \geq 9 sont multiples.

A concentration élevée, il est décrit que les oligogalacturonides de DP \geq 9 induisent une série de mécanismes de défense tels que l'activation de la PAL (1, phénylalanine ammonia lyase ; *Bruce et al., 1989*) ou la lignification de la paroi (2) via une voie de transduction du signal qui est dépendante du calcium et du pH cytosolique (3). D'après les résultats obtenus, l'activation du gène *wak1* par les oligogalacturonides de DP \geq 9 emprunterait une autre voie de transduction du signal indépendante du calcium (4). A l'heure actuelle, on ne sait pas si WAK1 joue le rôle de récepteur ou si plusieurs récepteurs membranaires sont impliqués.

Parallèlement, l'activation de la production de peroxyde d'hydrogène par les oligogalacturonides de DP \geq 9 induirait l'accumulation d'acide salicylique (5), l'activation de la voie du méthyljasmonate (6) et le « cross-linking » des protéines pariétales. Ces deux derniers effets pourraient éventuellement être détectés par la protéine WAK1 et exercer un effet sur l'auto-régulation du récepteur.

D'après la littérature, une voie de transduction du signal médiée par les protéines kinases initiée par WAK1 ou le(s) récepteur(s) potentiel(s) aux oligogalacturonides conduirait à l'activation du régulateur NPR1 via l'activation de SIPK (7), activée également par l'acide salicylique. Le régulateur NPR1 est responsable de la régulation de la transcription de *wak1* et des gènes encodant les protéines PR-1 et 2 (*Kohorn et al., 1998 ; Ryals et al., 1997 ; Fobert et al., 2000*).

Le schéma reprend également l'effet « feed-back » positif de WAK1 sur la régulation de sa propre transcription via l'activation de NPR1 (8), ainsi que l'effet protecteur vis-à-vis des concentrations élevées en acide (9, *Kohorn et al., 1998*).

Ce schéma, non exhaustif, constitue une base de travail pour la conception de nouvelles expériences.

VI

Perspectives

VI

Perspectives

VI Perspectives

Nous nous sommes focalisés au cours de ce mémoire sur la recherche de modulateurs qui pouvaient modifier le taux de transcrits et de protéines de WAK1. Cette étude n'étant pas exhaustive, il reste encore de nombreuses substances à tester pour définir clairement le mode de régulation de la protéine WAK1, notamment investiguer l'effet des oligogalacturonides de degré de polymérisation < 9 puisque ces fragments ont rarement été décrits comme ayant des fonctions biologiques. Il sera également nécessaire de répéter ces expériences afin d'établir un intervalle de confiance pour chacune des données expérimentales.

Une autre perspective serait de se focaliser sur la protéine WAK1 et des interactions que celle-ci peut réaliser avec les constituants de la paroi et, notamment, les fragments pectiques grâce aux techniques de co-immunoprécipitation et de chromatographie d'affinité. La technique du double-hybride permettrait également d'investiguer plus en profondeur l'interaction de WAK1 avec d'autres protéines récemment décrite dans la littérature (*Park et al., 2001*). On pourrait ainsi imaginer, de proche en proche, « redescendre » la voie de transduction du signal pour aboutir aux facteurs de transcription contrôlant *wak1*. Cette approche permettrait, entre autres, de savoir si WAK1 est autophosphorylée ou d'identifier des réseaux de transduction du signal impliquant WAK1.

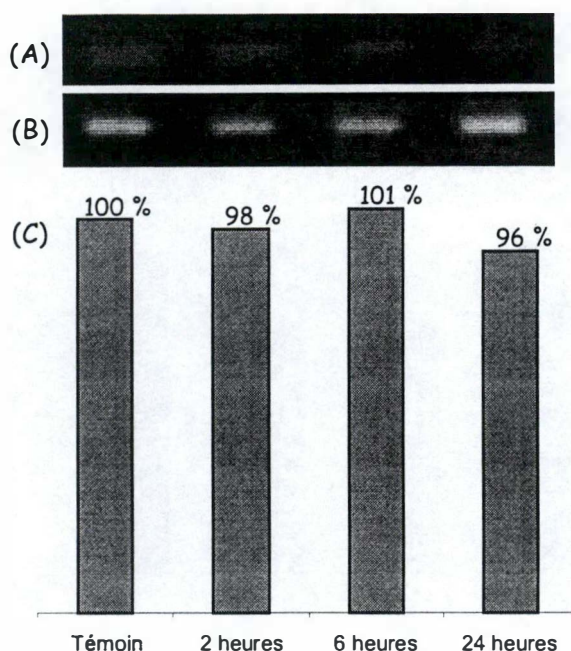
L'étude du récepteur et de son mode de régulation peuvent aussi être investigués au moyen d'autres techniques. Tout d'abord, il serait intéressant de transformer des plantes avec le promoteur de *wak1* couplé à un gène rapporteur. Ceci permettrait d'étudier la séquence du promoteur de *wak1* et d'identifier des régions CIS importantes contrôlant la transcription de *wak1*. Enfin, ces éléments CIS pourraient être exploités pour identifier des facteurs de transcription par une combinaison d'EMSA et de chromatographie d'affinité.

VII

Annexes

VII

Annexes



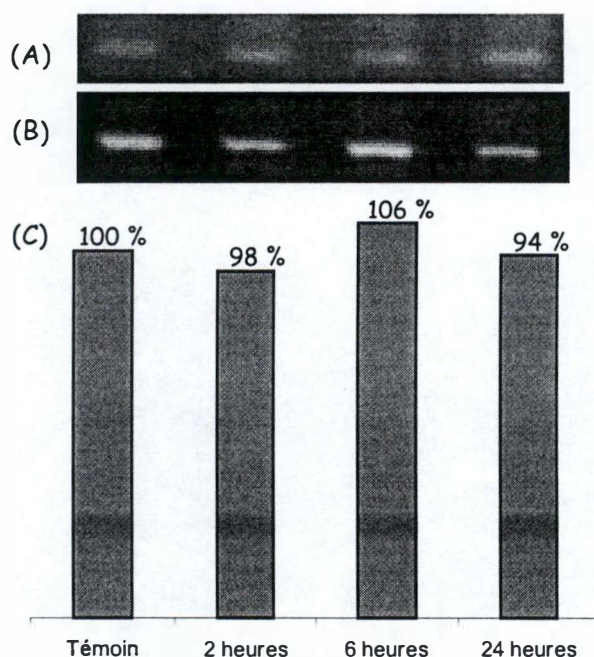
Annexe 1: Effet des pectinases sur le niveau des transcrits de wak1 après un traitement de 2, 6 et 24 heures avec une activité de 0.57 U/ml

Les prélèvements d'amplicons (5 μ l) ont été réalisés après 25 cycles d'amplification et déposés sur gel d'agarose 2 %

(A) Amplification RT-PCR avec les amorces de l'ubiquitine

(B) Amplification RT-PCR avec les amorces de wak1

(C) Histogramme reprenant le rapport entre l'intensité des amplifications wak1 et l'intensité des amplifications ubiquitine correspondantes. La valeur de 100 % est attribuée au témoin non traité et les valeurs des échantillons sont exprimées par rapport à celui-ci.



Annexe 2 : Effet des pectinases sur le niveau des transcrits de wak1 après un traitement de 2, 6 et 24 heures avec une activité de 1.14 U/ml

Les prélèvements d'amplicons (5 μ l) ont été réalisés après 25 cycles d'amplification et déposés sur gel d'agarose 2 %

(A) Amplification RT-PCR avec les amorces de l'ubiquitine

(B) Amplification RT-PCR avec les amorces de wak1

(C) Histogramme reprenant le rapport entre l'intensité des amplifications wak1 et l'intensité des amplifications ubiquitine correspondantes. La valeur de 100 % est attribuée au témoin non traité et les valeurs des échantillons sont exprimées par rapport à celui-ci.

VIII

Bibliographie

VIII

Bibliographie

VIII Bibliographie

1. **Albert, T.**(1992) : Structure of the leucine zipper. *Curr Opin Genet dev.***2**,205-210.
2. **Alfano, J.R. and Colmer, A.**(1996) : Bacterial pathogens in plants : life up against the wall. *Plant cell* **8**,1683-1698.
3. **Becraft, P.W.**(1998) : Receptor kinase in plant development. *Trends Plant Sci.***3**(10),384-388.
4. **Beffa, R.S., Hofer, R.-M., Thomas, M. and Meins, F., Jr.**(1996) : Decreased susceptibility to viral disease of Beta 1-3 glucanase deficient plants generated by antisens transformation.,*Plant cell* **8**,1001-1011.
5. **Bent, A.F., Kunkel ,B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R.L., Giraudat ,J., Leung, J.L., and Staskawicz, B.J.** (1994) : Rps2 of *Arabidopsis thaliana* : a leucine rich repeat class of plant disease resistance genes.*Science*,**265**,1856-1860.
6. **Bent, F.**(1996) : Plant disease resistance genes:Function meets structure. *Plant cell*,**8**,1757-1771
7. **Brisson, L.F., Tenhaken, R., and Lamb, C.**(1994) : Function of oxydative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant cell* **6**,1673-1678.
8. **Bruce, R.J., and West, C.A.** (1989) : Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxydase activity by pectic fragments in suspension culture of castor bean. *Plant Physiol.*,**9**,699-705
9. **Buchanan, Gruissem and Jones** (2000) : Biochemistry and molecular biology of plants ; American society of plant physiologists.
10. **Chory, J., Look, R.K., Elich, T., Frankhauser, C., Li, J., Nagpal, P., Neff, M., Pepper, A., Reed, J., and Vitard, V.** (1996) : From seed germination to flowering : light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proc. Natl. Ac. Sci. USA.*,**55**,12066-12071.
11. **Callow, J.A.** (1995) : Advances in botanical research, incorporating advances in plant pathology,**21**,2-34
12. **Carpita, N.C., and Gibeau, D.M.** (1993) : Structural models of primary cell walls in flowering plants : consistency of molecular structure with the physical properties of the cell wall during growth. *Plant J.*,**3**,1-30
13. **Clarck, S.E., Stone, J.M., Trotochaud ,A.E., and Walker, J.C.**(1998) : Control of meristem development by CLAVATA1 receptor kinase and kinase associated protein phosphatase interaction. *Plant Physiol.*,**117**,1217-1225.
14. **Conner, J.A.**(1997) : Transgene induced silencing of S-locus genes and related genes in Brassica. *Plant J.*,**11**,809-823.

15. **Dangl, J.L., Dietrich, R.A., and Richberg, M.H.**(1996) : Death don't have no mercy :cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant cell* **8**,1793-1807.
16. **Dangl, J.L., and Mc Dowell, J.M.** (2000) : Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem. Sci.*,**25**,79-82.
17. **Dixon, R.A., Harrison, M.J., and Lamb, C.J.**(1994) : Early events in the activation of plants defense responses. *Annu.Rev.Phytopathol.* **32**,479-501.
18. **Dong, X., Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., and Volko,S.** (1997) : The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*,**88**,57-63.
19. **Farmer, E.E., and Ryan, C.A.**(1992): Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *The Plant cell*,**4**,129-134.
20. **Fobert, P.R., Després, C., DeLong, C., Glaze, S., and Liu, E.** (2000) : The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell*,**12**,279-290
21. **Fransisco, J.Corpas, Barroso, J.B. and Luis, and A. del Rio** (2001) : Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci.*,**6**,145-150
22. **Hanks, S.K., Quinn, A.M., and Hunter , T.**(1988) :The protein kinase family :conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**,42-52.
23. **Helleboid, S., Chapman, A., Hendriks, T., Inze, D., Vasseur, J., and Hilbert, J.L.** (2000) : Cloning of β -1,3-glucanases expressed during *Cichorium* somatic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.*,**42**(2),377-386
24. **Herbers, K., Conrads-Strauch, J. and Bonas, U.**(1992) : Race-specificity of plant resistance to bacterial spot disease is determined by repetitive motifs in a bacterial avirulence protein. *Nature* **356**,172-174.
25. **Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J.** (1990) : PCR protocols: a guide to methods and applications, 10, Academics press, Inc., 1990
26. **Johnson, J.,Delaney, T.P.,Jesse, and T.,Vos, P.** (1997) : The Arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I κ B.
27. **Jones, A.M., and Dangle, J.L.**(1996) : Logjam at the styx :Programmed cell death in plants. *Trends Plant Sci.* **1**,114-119.
28. **Jones, D.G. ,Kim, E., and Hammond-Kosack.**(1996) : Resistance gene-dependant plant defense responses. *The plant cell*,**8**,1773-1791.

29. **Kao, T.H., Mu, J.H., and Lee, H.S.**(1994) : Characterization of a pollen expressed receptor-like kinase gene of *Petunia inflata* and the activity of its kinase. *Plant cell*,**6**,709-721.
30. **Klessig, F., and Shah, J.**(1996) : Identification of a salicylic acid-responsive element in the promoter of the tobacco pathogenesis-related Beta-1,3-glucanase gene,PR-2d. *The plant journal*,**10**(6),1089-1101.
31. **Knogge, W.**(1996) : Fungal infection of plants. *Plant cell* **8**,1711-1722.
32. **Kobe, B. and Deisenhofer, J.**(1994) : The leucine rich-repeat : a versatile binding motif. *Trends Biochem.Sci.* **19**,415-421.
33. **Kohorn, B.D., Lane, S., and Smith, T.A.**(1992) : An Arabidopsis serine-threonine kinase homologue with an EGF repeat selected in yeast for its specificity for a thylakoid membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**,10989-10992.
34. **Kohorn, B.D., He, Z.-H., and Fujiki, M.** (1996) : A cell-wall associated, receptor-like protein kinase. *J.Biol.Chem.*,**271**(33),19789-19793
35. **Kohorn, B.D., He, Z.-H., and He, D.**(1998) : Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response.,*Plant journal*,**14**(1),55-63.
36. **Kohorn, B.D., He, Z.-H., He, D., and Cheesman, I.**(1999) : A cluster of five cell wall-associated receptor kinase genes, *Wak1-5*, are expressed in specific organs of Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.*,**39**,1189-1196.
37. **Kohorn, B.D., and Wagner, T.A.** (2001) : Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. *Plant Cell*,**13**,303-318
38. **Leblanc, C., Falciatore, A., Watanabe, M., and Bowler, C.** (1999) : Semi-quantitative RT-PCR analysis of photoregulated gene expression in marine diatoms. *Plant.Mol.Biol.*, **40**, 1031-1044
39. **Legendre, L., Rueter, S., Heinstein, P.F., and Low, P.S.** (1993) : Characterization of the oligogalacturonide-induced oxydative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells. *Plant Physiol.*,**10**,233-240
40. **Leon, J., Lawton, M.A., and Raskin, I.**(1995) : Hydrogen peroxyde stimulates AS biosynthesis in tobacco. *Plant physiol.*,**108**,1673-1678.
41. **Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., and Lamb, C.**(1994) : H2O2 from the oxydative burst orchestrate the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**,583-593.
42. **Li, S. and Chory, J.** (1997) : A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*,**90**,929-938.

43. **Mae, A., and Koiv, V.** (2001) : Quorum sensing controls the synthesis of virulence factors modulating rsmA gene expression in *Erwinia carotovora*. *Mol.Genet.Genomics*, **265**(2), 287-292
44. **McDowell, J.M., Dhandaydham, M., Long, T.A., Aarts, M.G.M., Goff, S., Holub, E.B., and Dangl, J.L.** (1998) : intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the RPP8 locus of *Arabidopsis*. *Plant cell*, **10**, 1861-1874.
45. **Medhy, M.C.** (1994) : Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant physiol.* **105**, 467-472.
46. **Meeley, R.B., Johal, G.S., Briggs, S.P., and Walton, J.D.** (1992) : A biochemical phenotype for a disease resistance gene of maize. *Plant Cell* **4**, 71-77.
47. **Messiaen, J., and Van Cutsem, P.** (1993) : Defense gene transcription in carrot cells treated with oligogalacturonides. *Plant cell physiol.* , **34**(7), 1117-1123.
48. **Messiaen, J., Van Cutsem, P.** (1994a) : Pectic signal transduction in carrot cells: Membrane, cytosolic and nuclear responses induced by oligogalacturonides. *Plant cell physiol.*, **35**(4), 677-689.
49. **Messiaen, J.** (1994b) : La transduction du signal chez les végétaux supérieurs en réponse à une attaque pathogène: identification de réponses membranaires, cytosoliques et nucléaires induites par les oligogalacturonides. *FUNDP*, 257-258
50. **Meyerowitz, E.M., Clarck, S.E., Jacobsen, S.E., and Levin, J.Z.** (1996) : The CLAVATA and SHOOT MERISTEM LESS loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Dev.*, **122**, 1567-1575.
51. **Meyerowitz, E.M., Hua, J., Sakai, H., Nourizadeh, S., Chen, Q.G., Bleeker, A.B., and Ecker, J.R.** (1998a) : EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylen receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant cell*, **10**, 1321-1332
52. **Meyerowitz, E.M., Hua, J., Sakai, H., Nourzadeh, S., Chen, Q.G., and Bleeker, A.B.** (1998b) : ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylen signaling in *Arabidopsis*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, **95**, 5812-5817
53. **Morris, E.R., Powell, D.A., Gildey, M.J., and Rees, D.A.** (1982) : Conformation and interactions of pectins. I. Polymorphism between gel and solid states of calcium polygalacturonate. *J.Mol.Biol.*, **155**, 507-516
54. **Mulder, K.M.** (2000) : Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **11**(1-2), 23-35
55. **Osbourn, A.E.** (1996) : Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant cell* **8**, 1711-1722.

56. **Pallas, J.A., Paiva, N.L., Lamb, C., and Dixon, R.A.** (1996) : Tobacco plants epigenetically suppressed in PAL expression do not develop SAR in response to infection by TMV., *Plant journal*, **10**(2), 281-293.
57. **Park, O.K., Park, A.R., Cho, S.K., Yun, U.J., Jin, M.Y., Lee, S.H., and Sachetto-Martins, G.** (2001) : Intercation of the Arabidopsis receptor protein kinase *WAK1* with a glycine rich protein AtGRP-3. *J.Biol.Chem.* in press. Published on May 2, 2001 as manuscript M101283200
58. **Reichert, W., and Muller, I.M.** (1999) : Ethylene modulates gene expression in cells of the marines sponge *Suberites domuncula* and reduces the degree of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **274**(3), 1524-1530.
59. **Rothstein, S.J., Lui, Y., and Brugière, N.** (2000) : Molecular mechanisms of self-recognition in Brassica self-incompatibility. *Trends Plant Sci.*, **5**(10), 432-438.
60. **Rothstein, S.J. and Goring, D.R.** (1992) : The S-locus receptor kinase gene in a self-incompatible Brassica napus line encodes a fonctionnal serine/threonine kinase. *Plant cell*, **4**, 1273-1281.
61. **Weymann, K., Hunt, M., Uknes, S., Neuenschwander, U., Lawton, K., Steiner, H.-Y.** (1995) : Suppression and restoration of lesion formation in Arabidopsis lsd mutants. *The plant cell*, **7**, 2013-2022.
62. **Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H.Y., Johnson, J., Delaney, T.P., Jesse, T., Vos, P., Uknes, S.** (1997) : The Arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor IkappaB. *The plant cell*, **9**, 425-439.
63. **Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y., and Hunt, M.D.** (1996): Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**, 1809-1819.
64. **Ryan, C.A.** (2000) : The systemin signaling pathway : differential activation of plant defensive gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1477**, 112-121
65. **Saraste, M., Sibbald, P.R., and Wittinghofer, A.** (1990) : The P-loop : a common motif in ATP et GTP binding proteins. *Trends Biochem*, **15**, 430-434.
66. **Schopfer, C.R.** (1999) : The male determinant of self-incompatibility in Brassica. *Science*, **288**, 1597-1700.
67. **SchulzeLefert, P., Buschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T., Groenendijk, J., Topsch, S., Vos, P., Salamini, F.** (1997) : The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*, **88**, 695-705.
68. **Schumaker, K. and Chory, J.** (2000) : Brassinosteroids signal transduction: still casting the actors. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **3**, 79-84.

69. *Showalter, A.M.*(1995):Structure et function of plant cell wall proteins., *Plant cell*,**5**,9-23.
70. *Silverman, P., Seskar, M., Kanter, D., Schweizer, P., Métraux, J.-P., and Raskin, I.*(1995) : Salicylic acid in rice. *Plant physiol*,**108**,633-639.
71. *Song, P.S., Lapko, V.N., Wells, T.A.* (1996) : Protein kinase A-catalized phosphorylation and its effect on conformation in phytochrome A. *Biochemistry*,**35**(21),6585-6594.
72. *Sopory, S.K., Chandock, M.R.* (1996) : Phosphorylation /dephosphorylation steps are key events in the phytochrome mediated enhancement of nitrate reductase mRNA levels and enzyme in maize. *Mol.Gen.Genet.*,**251**(5), 599-608
73. *Sopory, S.K., Chandok, M.R.* (1998) : ZmcPKC70, a protein kinase C-type enzyme from Maize. *J. Biol. Chem.*,**273**(30),19235-19242
74. *Stamler, J.S. and Hansladen, A.* (1998) : Nitric oxyd in plant immunity. *Proc.Natl.Ac.Sci.USA*,**95**,10345-10347.
75. *Stepanova, A.N. and Ecker, J.R.*(2000) : Ethylene signaling: from mutants to molecules. *Curr. Opin. Plant Biol.*,**3**,353-360.
76. *Stephenson, A.*(1997) : The male determinant of self-incompatibility in Brassica oleracea is located in the pollen coating. *Plant J.*,**12**,1351-1359.
77. *Taraporewala, Z.F., and Culver, J.N.*(1996): Identification of an elicitor active site within the three dimensional structure of the tobacco mosaic virus coat protein. *The plant cell* **8**,169-178.
78. *Thain, J.F., Doherty, H.M., Bowles, D.J., Wildon, D.C.* (1990) : Oligosaccharides that induce proteinase inhibitor activity in tomato plants cause depolarization of tomato leaf cells. *Plant Cell. Environ*,**13**,569-574
79. *Thomma, B.* (1998) : Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc.Natl.Ac.Sci.USA*,**95**,15107-15111.
80. *Uknes, S., Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Leslie, F., Ellis, D., Steiner, H.Y., Van Kan, J.A.L., van den Ackerveken, G.F.J.M., and De Wit, P.J.G.M.* (1991) : Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene Avr9 of the fungal pathogen *C.fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Mol.plant-microbe interact.*, **4**,52-59.
81. *Vierstra, R.D., Clough, R.C., Jordan, E.T., Lohman, K.N., Marita, J.M., Walker, J.M.* (1999) : Sequences within both the N- and C- terminal domains of phyA are required for PFR ubiquitination and degradation. *Plant J.*,**17**(2),155-167
82. *Walbot, V., Jones, R.L., Somerville, C.R.* (1997) : Annual review of plant physiology and plant molecular biology,**48**,525-545

83. **Walker, J.C. and Braun, D.M.** (1996) : Plant transmembrane receptors : new pieces in the signaling puzzle. *Trends Biochem. Sci.*,21,70-73.
84. **Y.N., Yang and Gabriel, D.W.** (1995) : Xanthomonas avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signal. *Mol. Plant-microbe interact.*,8,627-631.
85. **Yokota, T.** (1997) : The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends Plant Sci.*,2,137-147.